

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

***Investigação do dano oxidativo em pacientes portadores de deficiências da
beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos e do efeito in vitro dos
metabólitos acumulados e da L-carnitina sobre o dano ao DNA***

Maira Silmara de Moraes

Orientadora: Dra. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

***Investigação do dano oxidativo em pacientes portadores de deficiências da
beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos e do efeito in vitro dos
metabólitos acumulados e da L-carnitina sobre o dano ao DNA***

Maira Silmara de Moraes

Orientadora: Dra. Carmen Regla Vargas

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Moraes, Maira Silmara de
Investigação do dano oxidativo em pacientes
portadores de deficiências da beta-oxidação
mitocondrial de ácidos graxos e do efeito in vitro dos
metabólitos acumulados e da L-carnitina sobre o dano
ao DNA / Maira Silmara de Moraes. -- 2019.
97 f.
Orientadora: Carmen Regla Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Estresse Oxidativo. 2. Beta-oxidação
mitocondrial de ácidos graxos. 3. L-carnitina. I.
Vargas, Carmen Regla, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“A imaginação é mais importante
que o conhecimento.
O conhecimento é limitado.
A imaginação circunda o mundo.”

Albert Einstein.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de ter uma formação pública e de qualidade.

À minha orientadora Carmen, pelo acolhimento, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pelo exemplo de pessoa humana e de profissional focada que é para todos os alunos.

Aos meus colegas de laboratório, Jéssica, Camila, Tati Hau, Tati Ham, Gilian, Carlos, Bruna, Desi e Alana, pela união do grupo, pelo companheirismo e por todo o auxílio nas diversas vezes que foram necessárias e sempre estiveram à disposição.

Ao Departamento de Bioquímica e a todos os professores com quem fiz disciplinas, pelos conhecimentos compartilhados e pela dedicação.

A todos os funcionários do Serviço de Genética Médica, por toda a colaboração, em especial do Laboratório de Análise de Metabólitos, Ângela e Daniela.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À minha família, mãe, pai e irmão, Neusa, Pedro e Marcos, pelo imenso apoio, mesmo que a busca dos meus sonhos significasse mais tempo distante e mais aniversários ausente, e pelo amor incondicional.

Aos meus amigos da faculdade e da vida, que tornaram os momentos difíceis mais leves e divertidos e menos dramáticos.

Ao meu namorado, Gauthier, pela ajuda técnica com as planilhas de cálculo, pela compreensão nos períodos mais complicados e pelo suporte emocional sempre.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	8
1.2 Defeitos de Beta-Oxidação Mitocondrial de Ácidos Graxos.....	9
1.2.1 Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média.....	12
1.2.2 Deficiência da desidrogenase de 3-hidroxiacil-CoA de cadeia longa.....	14
1.2.3 Deficiência da desidrogenase múltipla de acil-CoA.....	15
1.3 Radicais Livres.....	16
1.4 Defesas antioxidantes.....	19
1.5 Estresse Oxidativo.....	21
1.6 Dano ao DNA.....	22
1.7 L-carnitina.....	24
1.8 Estresse Oxidativo nos Defeitos da Oxidação de Ácidos Graxos.....	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. RESULTADOS	30
3.1 Capítulo 1 - Artigo 1: Oxidative Damage in Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency and Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency patients and the <i>invitro</i> effect of L-	

carnitine on DNA damage induced by the metabolites adipic acid, suberic acid, hexanoylglycine and suberylglycine.....	30
4. DISCUSSÃO.....	63
5. CONCLUSÕES.....	73
6. PERSPECTIVAS.....	75
7. REFERÊNCIAS	76
8. ANEXOS.....	83
8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	83
8.2 Ficha de dados dos indivíduos.....	84
8.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: pacientes portadores de Defeitos na Beta-Oxidação de Ácidos Graxos.....	86
8.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: indivíduos controle.....	89

RESUMO

As deficiências na beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos são Erros Inatos do Metabolismo (EIM), doenças genéticas raras que se caracterizam pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia de diferentes tamanhos, conforme a enzima afetada, em fluidos e tecidos corporais. Elas são ocasionadas por vários tipos de mutações, que comprometem a codificação adequada das enzimas desidrogenases envolvidas na oxidação mitocondrial dos ácidos graxos para serem utilizados como fonte energética alternativa durante o jejum. Embora os mecanismos fisiopatológicos dessas doenças ainda não estejam completamente esclarecidos, estudos mostram que o acúmulo de metabólitos tóxicos pode estar relacionado. Considerando estudos realizados em modelos animais e em outros EIM que demonstraram que os metabólitos tóxicos podem alterar os parâmetros de estresse oxidativo, os objetivos deste trabalho foram avaliar a lipoperoxidação através da medida de 8-isoprostanos, avaliar o dano oxidativo ao DNA e ao RNA através da medida de espécies oxidadas de guanina e avaliar parâmetros de estresse nitrosativo através da medida do conteúdo de nitritos e nitratos em amostras de urina de pacientes portadores da deficiência da desidrogenase de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia longa (LCHADD), da deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCADD) e da deficiência da desidrogenase múltipla de acil-CoA (MADD). Além disso, foi também objetivo analisar o dano ao DNA *in vitro* induzido pelos metabólitos ácido subérico, ácido adípico, hexanoilglicina, suberilglicina, isoladamente e conjuntamente, bem como o efeito da co-incubação com o antioxidante L-carnitina, através no ensaio cometa em leucócitos humanos. Foi observado um aumento significativo dos níveis de 8-isoprostanos na urina de todos os grupos de pacientes comparado à urina do

grupo controle, indicando lipoperoxidação. Os níveis de nitritos e nitratos estavam significativamente aumentados apenas na urina de pacientes portadores da LCHADD, sugerindo estresse nitrosativo nesse grupo de pacientes em comparação ao grupo controle. A análise de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina revelou aumento significativo dos níveis deste biomarcador na urina de pacientes com LCHADD e MADD, sugerindo dano oxidativo ao DNA nesses grupos de pacientes em comparação ao grupo controle. Na avaliação *in vitro*, foi identificado aumento significativo no índice de dano ao DNA induzido por todos os metabólitos estudados, isoladamente e conjuntamente, sendo que a incubação conjunta apresentou um efeito danoso potencializado. A L-carnitina foi capaz de diminuir significativamente o índice de dano ao DNA induzido por todos os metabólitos, exceto pelo ácido subérico. Esses resultados demonstram que o acúmulo de metabólitos tóxicos pode estar relacionado aos parâmetros de estresse oxidativos e nitrosativo aumentados na urina de pacientes com deficiência na beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos, e que os metabólitos ácido adípico, ácido subérico, hexanoilglicina, suberilglicina, isolados ou em conjunto, causam dano ao DNA, que foi revertido pela L-carnitina, conferindo proteção oxidante.

Palavras-chave: Defeitos da Oxidação de Ácidos Graxos, Estresse Oxidativo, L-carnitina.

ABSTRACT

The mitochondrial fatty acids oxidation disorders (FAOD) are Inborn Errors of Metabolism (IEM) which are rare genetic diseases characterized by the accumulation of fatty acids of different sizes of chain according to the affected enzyme in tissue and body fluids. They are caused by several types of mutations that compromise the correct encoding of the dehydrogenase enzymes evolved on the fatty acids mitochondrial oxidation in order to be utilized as an alternative source of energy during fasting. Although the pathophysiological mechanisms underlying these disorders are still not completely understood, studies have demonstrated that the accumulation of toxic metabolites may be related. Considering previous studies in animal models and in others IEM that verified that toxic metabolites may alter the oxidative stress parameters, the aims of this study were to evaluate the lipid peroxidation by the measurement of 8-isoprostanes, to evaluate DNA and RNA oxidative damage by the measurement of oxidized guanine species and to evaluate nitrosative stress parameters by the measurement of nitrite and nitrate content in urine samples of long-chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) and multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) patients. Moreover, it was also an objective to evaluate the *in vitro* DNA damage of the metabolites adipic acid, suberic acid, hexanoylglycine and suberylglycine, separated and together, and the effect of L-carnitine by the comet assay in human leukocytes. It was observed a significant increase on 8-isoprostanes levels in urine of all groups of patients compared to the control group, indicating lipoperoxidation. The nitrite and nitrate levels were significantly increased only in urine of LCHADD patients, suggesting

nitrosative stress in this group of patients compared to the control group. The analysis of DNA and RNA damage revealed significant increase on 8-hydroxy-2-deoxyguanosine levels in urine of LCHADD and MADD patients, suggesting oxidative damage in these groups of patients compared to the control group. In the *in vitro* evaluation, we identified a significant increase of the DNA damage index induced by all metabolites, separated and together, and the incubation with all metabolites together resulted in a potencialized effect. L-carnitine was capable of decrease significantly the DNA damage index induced by all metabolites, except by suberic acid. These results demonstrate that the accumulation of toxic metabolites may be related to the increased oxidative and nitrosative stress parameters in urine of patients with the fatty acids oxidation disorders and that the metabolites adipic acid, suberic acid, hexanoylglycine and suberylglycine, separated and together, cause DNA damage, which was reduced significantly by L-carnitine, demonstrating antioxidant protection.

Key words: Fatty Acids Oxidation Disorders, Oxidative Stress, L-carnitine.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina trifosfato

CAT - Catalase

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EIM - Erros Inatos do Metabolismo

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FAOD - do inglês *Fatty Acids Oxidation Disorder*

GPx - Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione Redutase

GSH - Glutathione Reduzida

GSSG - Glutathione Oxidada

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

L- CAR - L-carnitina

LCHADD - Deficiência da 3-Hidroxiacil-CoA Desidrogenase de Cadeia Longa

LCHAD - 3-Hidroxiacil-CoA Desidrogenase de Cadeia Longa

MADD - Deficiência de Múltiplas Acil-CoA Desidrogenases

MAD – Desidrogenase Múltipla de Acil-CoA

MCADD - Deficiência da Acil-CoA Desidrogenase de Cadeia Média

MCAD - Acil-CoA Desidrogenase de Cadeia Média

NOS - Óxido Nítrico Sintase

O₂⁻ - Ânion superóxido

OH^{*} - Radical hidroxila

ONOO⁻ - Peroxinitrito

RL - Radical Livre

RNA - Ácido Ribonucleico

SOD - Superóxido Dismutase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota metabólica mitocondrial dos ácidos graxos com remoção de dois átomos de carbono formando acetil-CoA	11
Figura 2. Padrão de herança autossômico recessivo	14
Figura 3. Formação das espécies reativas de oxigênio.....	18
Figura 4. Defesas antioxidantes enzimáticas	20
Figura 5. Estados de equilíbrio e de desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e o sistema de defesa antioxidante (SDA).....	22
Figura 6. Tipos de dano ao DNA	23
Figura 7. Estrutura química da L-carnitina.....	25

1. INTRODUÇÃO

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são doenças genéticas raras causadas pela codificação incorreta de uma proteína, muitas vezes uma enzima, que tem sua atividade comprometida parcial ou totalmente. Essa modificação na atividade protéica resulta no bloqueio de uma rota metabólica com acúmulo dos substratos e diminuição na síntese dos produtos. A incidência dessas doenças, consideradas individualmente, é rara, mas conjuntamente elas atingem aproximadamente um para cada mil nascimentos, e uma das principais dificuldades de diagnóstico de muitas delas se dá pela rápida evolução do quadro clínico dos pacientes a óbito, muitas vezes sem a correta identificação da causa do óbito (Scriver et al., 2001). Os EIM podem ser classificados em três grandes grupos, segundo Saudubray e Charpentier (2001):

I - Distúrbios de síntese ou de degradação de moléculas complexas, como por exemplo, as doenças lisossomais de depósito e as doenças peroxissomais.

II - Doenças com déficit energético, como as doenças de depósito de glicogênio, os defeitos da gliconeogênese, os defeitos na beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos e outros defeitos mitocondriais ou de cadeia respiratória.

III - Erros inatos do metabolismo intermediário, que englobam as aminoacidopatias, as acidemias orgânicas, os defeitos do ciclo da ureia e as intolerâncias aos açúcares.

Os defeitos na beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos têm origem nas deficiências hereditárias das enzimas que catalisam as reações, resultando em acúmulo dos metabólitos no sangue e a excreção dos mesmos na urina.

1.2 Defeitos de Beta-Oxidação Mitocondrial de Ácidos Graxos

A principal fonte de energia para a síntese de ATP nas células humanas, durante períodos de estresse metabólico e jejum prolongado, vem da beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos, processo catabólico que gera ATP e acetil-CoA, convertida em corpos cetônicos no fígado, sendo o último transportado para ser utilizado por outros tecidos, como músculo cardíaco, músculo esquelético e cérebro. A oxidação dos ácidos graxos é complexa e envolve vários passos sendo I) a captação celular de ácidos graxos; II) a conversão do ácido graxo a acil-CoA-graxo; III) a transesterificação a acilcarnitinas; IV) a translocação através da membrana mitocondrial; V) a re-esterificação a acil-CoA-graxo e finalmente o ciclo de reações intramitocondrial que removem sucessivamente dois átomos de carbono na forma de acetil-CoA (oxidação, hidratação, oxidação e cisão) e fornecem elétrons para os cofatores NAD e FAD, como ilustra a figura 1 (Smiths, Marks e Lieberman, 2005). Conforme o comprimento da cadeia carbônica de cada ácido graxo, há uma enzima catalítica correspondente: as desidrogenases de acil-CoA de cadeia muito longa (VLCAD - *very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase*), média (MCAD - *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*) e curta (SCAD - *short-chain acyl-CoA dehydrogenase*), e as desidrogenases de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia longa (LCHAD - *long-chain hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase*) e curta (SCHAD - *short-chain hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase*). Em situações onde uma dessas enzimas sofre mutações que comprometam sua funcionalidade, haverá acúmulo do metabólito que deveria ser oxidado na remoção sucessiva de acetil-CoA, característico desse tipo de deficiências genéticas raras (Roe e Ding, 2001).

Os pacientes portadores destas deficiências geralmente apresentam um quadro clínico de hipoglicemia hipocetótica, acidose metabólica e hipotonia. O diagnóstico laboratorial dessas doenças é realizado pela detecção de acilcarnitinas no sangue por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC/MS/MS) e de ácidos orgânicos na urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS); a análise molecular identifica a mutação que causa o comprometimento da função das enzimas e a avaliação da atividade enzimática em leucócitos, fibroblastos ou outros tecidos revela o grau de comprometimento da enzima (Scriver et al., 2001).

A maioria dos estudos que descrevem os efeitos tóxicos de ácidos graxos e seus derivados relaciona a um mecanismo fisiopatológico de bloqueio em passos do metabolismo energético. Esses mecanismos envolvem a diminuição na síntese de corpos cetônicos durante o jejum, aumentando a utilização da glicose sanguínea como fonte de energia para as células e resultando em hipoglicemia nos pacientes. Além disso, a não utilização dos ácidos graxos na síntese de corpos cetônicos leva ao acúmulo de acil-Coa de ácido graxo nas mitocôndrias, elevando a razão acil-Coa:CoA e inibindo enzimas que utilizam CoA como substrato, como a piruvato desidrogenase, levando à diminuição da conversão do piruvato a acetil-CoA e na velocidade do ciclo de Krebs. A baixa produção de acetil-CoA diminui a síntese de citrato, que é precursor de malato - necessário para a produção de glicose via gliconeogênese - e de malonil-CoA - regulador inibitório da CPT-I (enzima que transporta ácidos graxos de cadeia longa para o interior na mitocôndria).

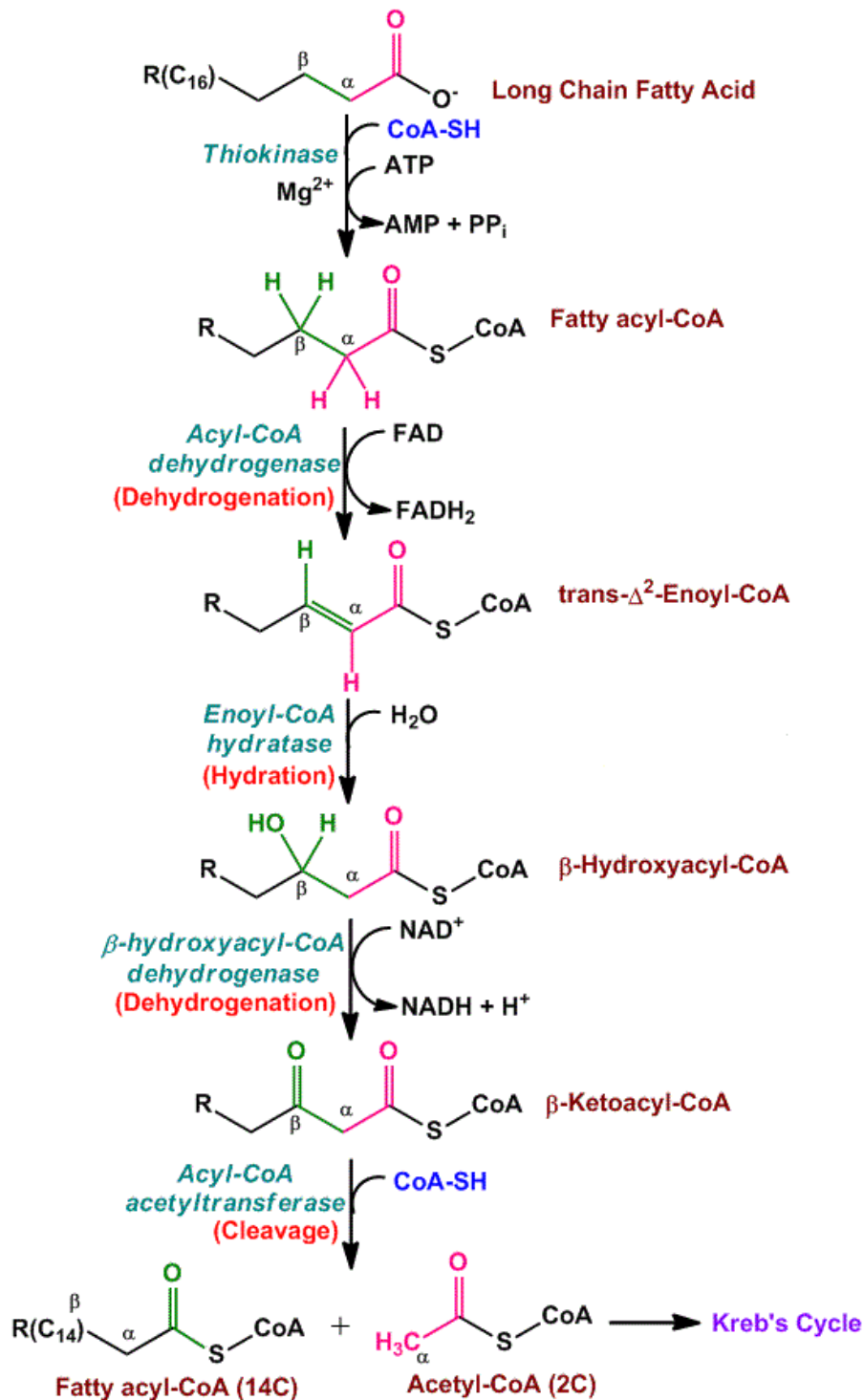


Figura 1. Rota metabólica mitocondrial dos ácidos graxos com remoção de dois átomos de carbono formando acetil-CoA. (Fonte: <https://pharmaxchange.info/2013/10/oxidation-of-fatty-acids/>)

Assim, a diminuição de citrato leva à redução da gliconeogênese e ao aumento da entrada de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria, agravando a

hipoglicemia e provocando acúmulo dos derivados de acil-CoA graxos nos pacientes (Roe e Ding, 2001). A toxicidade dos ésteres de acil-CoA pode contribuir para a elevação da mortalidade por causar distúrbios no ritmo cardíaco, falência respiratória e/ou hepática. Estudos demonstraram que acil-CoA inibiram a síntese de ATP, transportadores mitocondriais de ácidos dicarboxílicos e, ainda, enzimas da cadeia respiratória em preparações mitocondriais, reforçando que a acidose encontrada em pacientes afetados por essas doenças é devido a um possível distúrbio no sistema fosforilativo ocasionado pelo aumento intramitocondrial dos metabólitos tóxicos (Ventura et al., 2005). Acredita-se que o dano cerebral descrito nessas deficiências tem como causa principal a hipoglicemia observada nos pacientes afetados por estas doenças, mas considerando que pacientes apresentando níveis normais de glicose podem ter edema cerebral e mesmo coma, sugere-se que os metabólitos acumulados podem estar envolvidos na patogenia do dano neurológico (den Boer et al., 2002).

O aumento da lipólise pode ser observado, levando à disponibilidade de ácidos graxos em geral, potencialmente metabolizados pela atividade de outras enzimas envolvidas na beta-oxidação que não estão deficientes. Esse processo compensaria a demanda energética por um curto período, mas, ao mesmo tempo, aumentaria o risco de efeitos tóxicos mediados pelo acúmulo de ácidos graxos não metabolizados (Wanders et al., 1999).

1.2.1 Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média

A deficiência da enzima desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCADD), descrita em 1962, é o EIM mais comum dentre os distúrbios da beta-

oxidação, com incidência mundial de 1:14.000 nascidos vivos (Roe e Ding, 2001). Ela apresenta um padrão de herança autossômica recessiva (figura 2) que leva ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia média, como o ácido adípico, o ácido subérico, o ácido sebácico, a hexanoilglicina, a suberilglicina, a propionilglicina e seus derivados de carnitina no sangue e na urina (Onkenhout et al., 1995; Costa et al., 2000). A mutação mais observada é a resultante em uma substituição de lisina por ácido glutâmico no aminoácido 329, ocasionada por uma substituição de um nucleotídeo adenina no lugar da guanina na posição 985 do gene da MCAD (Matsubara et al., 1992). Os primeiros sinais clínico-laboratoriais surgem entre os primeiros dias de vida até os seis anos de idade e incluem hipoglicemia hipocetótica, acidose metabólica, hipotonia, vômitos, letargia, apnéia, coma e, em alguns casos, morte. Além disso, pode haver atraso no desenvolvimento psicomotor, rabdomiólise, paralisia cerebral, retardo no crescimento, problemas comportamentais e déficit de atenção (Grosse et al., 2006). O tratamento desta doença consiste em manter uma ingesta adequada de calorias, pobre em proteínas e gorduras e rica em carboidrato, evitar o jejum e ter cuidados especiais durante episódios de infecções. O prognóstico é bom em pacientes diagnosticados que evitam o jejum e que são manejados adequadamente durante crises metabólicas (Roe e Ding, 2001). Em certos pacientes com doenças metabólicas que acumulam ácidos orgânicos, a administração de L-carnitina tem sido feita, uma vez que a molécula se liga a estes compostos e permite que sejam excretados (Feillet et al., 2012).

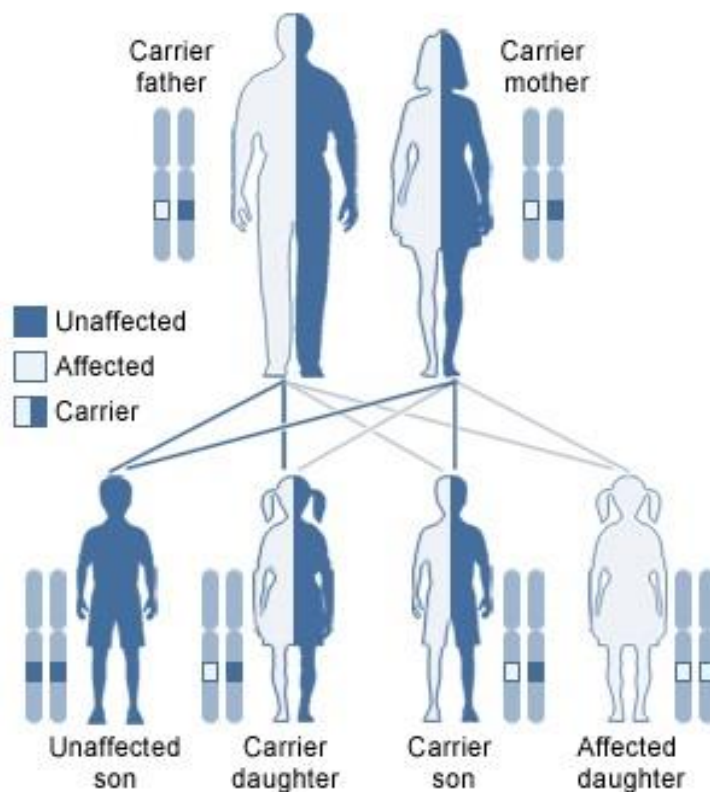


Figura 2. Padrão de herança autossômico recessivo. (Fonte:

<https://www.mayoclinic.org/autosomal-recessive-inheritance-pattern/img-20007457>)

1.2.2 Deficiência da desidrogenase de 3-hidroxiacil-CoA de cadeia longa

Na deficiência da enzima desidrogenase de 3-hidroxiacil-CoA de cadeia longa (LCHADD), a incidência mundial é de 1:250.000 nascidos vivos, apresentando um padrão de herança autossômica recessiva. A mutação que ocorre no gene HADHA, é resultante de uma substituição de ácido glutâmico por glutamina no aminoácido 510, ocasionada por uma substituição de um nucleotídeo guanina no lugar da citosina na posição 1528 (Matsubara et al., 1992). O diagnóstico é feito pelo perfil de acilcarnitinas no sangue ou ácidos orgânicos na urina e se observa a elevação de hidroxiacilcarnitinas de cadeia longa, como 3-hidroxi-tetradecanoilcarnitina, 3-hidroxi-

hexadecanoilcarnitina, 3-hidroxi-octadecanoilcarnitina e 3-hidroxi-octadecenoilcarnitina, além dos ácidos 3-hidroxi-dodecanóico, 3-hidroxi-sebácico, 3-hidroxi-butírico, 3-hidroxi-isovalérico, adípico, subérico e sebácico (Roe e Ding, 2001). Os sinais clínicos incluem hipoglicemia hipocetótica, acidose metabólica, cardiomiopatia e doenças hepáticas na infância. Os pacientes adultos podem apresentar intolerância ao exercício, retinopatia e neuropatia periférica crônica (Tyni et al., 1997). O tratamento consiste no fornecimento extra de energia na forma de carboidratos e triglicerídeos de cadeia média e dieta pobre em ácidos graxos de cadeia longa, bem como evitar o jejum, similar ao da deficiência de MCAD. O prognóstico era geralmente ruim, mas devido à detecção precoce e à adesão ao tratamento tem melhorado e permite que alguns pacientes sobrevivam até a vida adulta (Wanders et al., 1999; Spiekerkoetter et al., 2009). A suplementação de carnitina pode ser considerada em casos onde haja uma deficiência secundária, pois ela se conjuga aos metabólitos tóxicos acumulados, promovendo uma detoxificação desses compostos e sua eliminação. Entretanto, essa suplementação deve ser cuidadosamente acompanhada, pois o aumento nos níveis de hidroxilcarnitinas pode ser prejudicial (Rocchiccioli et al., 1990; Ribas et al., 2014).

1.2.3 Deficiência da desidrogenase múltipla de acil-CoA

A deficiência da enzima desidrogenase múltipla de acil-CoA (MADD), também conhecida como Acidemia Glutárica tipo II, é uma desordem da oxidação de ácidos graxos e de aminoácidos e tem padrão de herança autossômica recessiva, com incidência mundial de 1:200.000 nascidos vivos (Frerman et al., 1985). O diagnóstico da doença é realizado pelo perfil de acilcarnitinas no sangue, que podem apresentar

elevadas concentrações de glutarilcarnitina, isovalerilcarnitina, octanoilcarnitina, decanoilcarnitina, decenoilcarnitina, dodecanoilcarnitina, tetradecanoilcarnitina, tetradecenoilcarnitina hexadecanoilcarnitina, hexadecenoilcarnitina, octadecanoilcarnitina, octadecenoilcarnitina e pelo perfil de ácidos orgânicos na urina, o qual demonstra elevação de acilcarnitinas de cadeia de todos os tamanhos, e dos ácidos glutárico, 2-hidroxi glutárico, láctico, adípico, subérico, sebácico, etilmalônico, isovalérico, 3-hidroxiisovalérico, isovalerilglicina, isobutirilglicina, hexanoilglicina e butirilglicina (Roe e Ding, 2001). O defeito ocorre na flavoproteína de transferência de elétrons (ETF) mitocondrial ou no aceptor de elétrons, a flavoproteína de transferência de elétrons desidrogenase/ flavoproteína de transferência de elétrons-ubiquinona oxireductase (ETF-DH/ETF-QO). Ela é clinicamente heterogênea variando de uma forma neonatal severa que inclui hipoglicemia hipocetótica, acidose metabólica, hepatomegalia, cardiomiopatia e hipotonia até uma apresentação infantil/adulta moderada com episódios de descompensação metabólica, fraqueza muscular e falha respiratória (Pennisi, Garibaldi e Antonini, 2018). O tratamento consiste na alimentação frequente, com o propósito de evitar hipoglicemia e crise metabólica, em uma dieta rica em carboidratos e pobre em proteínas e gorduras (Vasiljevski et al., 2018). Em alguns casos, pode ser necessário fazer uma suplementação com riboflavina (doses variam de 100-400mg/dia), que é cofator enzimático (flavina-adenina dinucleótido - FAD) funcionando como uma chaperona molecular, estabilizando a enzima, e com carnitina, que detoxifica os metabólitos tóxicos pela reação de conjugação, formando intermediários menos danosos (Cornelius et al., 2012; Ribas et al., 2014).

1.3 Radicais Livres

Radical livre (RL) é uma estrutura química com um ou mais elétrons desemparelhados no seu último orbital atômico com capacidade de existir de forma independente, o que confere uma alta reatividade à molécula, com a possibilidade de iniciar reações em cadeia. Os RL podem ser formados pelo ganho de um elétron por uma molécula não-radical ou pela perda de um elétron de uma molécula não-radical, além de formação por uma fissão homolítica, em que há uma quebra de ligação covalente e cada átomo envolvido recebe um dos elétrons que eram compartilhados. Essa geração pode decorrer de processos metabólicos normais como a auto-oxidação de formas reduzidas de carreadores de elétrons, flavinas reduzidas, citocromo P-450, reações inflamatórias, etc. Além disso, o consumo de álcool, o uso de quimioterápicos e/ou de fatores ambientais como a irradiação (luz ultravioleta, raios X) e os poluentes na atmosfera (ozônio, dióxido de carbono, fumaça de cigarro) resultam na atividade aumentada dos sistemas geradores de RL (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Durante o metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular (O_2) sofre uma reação de redução tetravalente, na qual aceita quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). Aproximadamente 5% do O_2 usado na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial não é completamente reduzido a H_2O , e pode ser convertido em intermediários reativos de O_2 , como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil (OH^{\bullet}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Boveris, 1998).

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são compostos derivados do oxigênio não necessariamente radicalares, mas com capacidade de produzir radicais como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete, que não possuem elétrons desemparelhados (figura 3) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

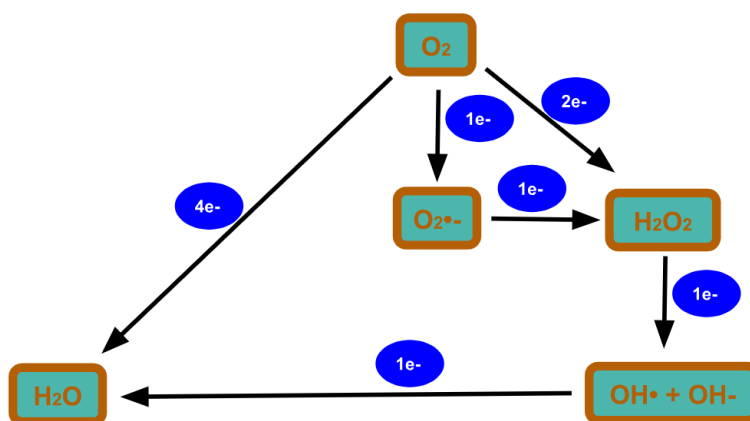


Figura 3. Formação das espécies reativas de oxigênio. (Fonte: adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007.)

Há também as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico (NO^\bullet), radical sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) nos sistemas biológicos. Ele pode reagir com $O_2^{\bullet-}$ e formar o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é um potente oxidante (Giuvili et al., 1998).

As EROs e ERNs ocorrem em diversas situações fisiológicas, nas quais desempenham funções como a regulação do tônus vascular e monitoramento da tensão de O_2 no controle da ventilação e na produção de eritropoietina, a liberação local de substâncias tóxicas oxidantes por neutrófilos para atuar na defesa do hospedeiro contra infecções, a sinalização celular e a síntese e regulação de proteínas (Bergendi et al., 1999)

Em condições patológicas, esse processo de produção de espécies reativas pode estar aumentado e ocasionar danos às células e aos seus componentes celulares, como os lipídeos, comprometendo a fluidez e a permeabilidade das membranas lipídicas, as proteínas, comprometendo processos enzimáticos e de

transporte, e DNA e RNA, comprometendo a manutenção do código genético celular, levando à alteração de bases púricas e pirimídicas e conseqüentemente a mutações (Halliwell e Whiteman, 2004; Delanty e Dichter, 1998).

1.4 Defesas antioxidantes

Os sistemas biológicos desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos de defesas antioxidantes capazes de converter as espécies reativas em derivados inativos e, assim, diminuir os danos ocasionados às células (Halliwell, 1994). Antioxidante é qualquer substância que retarda ou previne a oxidação de um substrato oxidável, presente em baixas concentrações em relação a esse substrato, e pode ser enzimático ou não enzimático (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). A CAT controla os níveis de peróxido de hidrogênio, catalisando a reação de duas moléculas de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A SOD catalisa a reação de dismutação de dois radicais $O_2^{\bullet-}$, com formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio. Essa reação pode acontecer espontaneamente em pH fisiológico, mas com a presença da SOD, a velocidade de reação é 10000 vezes maior (Halliwell e Gutteridge, 2007). Há três tipos principais da enzima:

1: A CuZn-SOD contém cobre e zinco no sítio ativo e são encontradas no citoplasma e nos fluidos celulares;

2: A Mn-SOD contém manganês no sítio ativo e são encontradas na matriz mitocondrial;

3: A ECSOD contém Cu e Zn e um peptídeo sinalizador responsável pelo seu direcionamento para o espaço extracelular.

A GPx catalisa a decomposição de hidroperóxidos com a utilização da glutatona reduzida (GSH), que forma glutatona oxidada (GSSG) - que é reduzida pela GR - e o produto de redução dos hidroperóxidos. Ela é encontrada em todos os tecidos animais, no citosol e na matriz mitocondrial (figura 4).

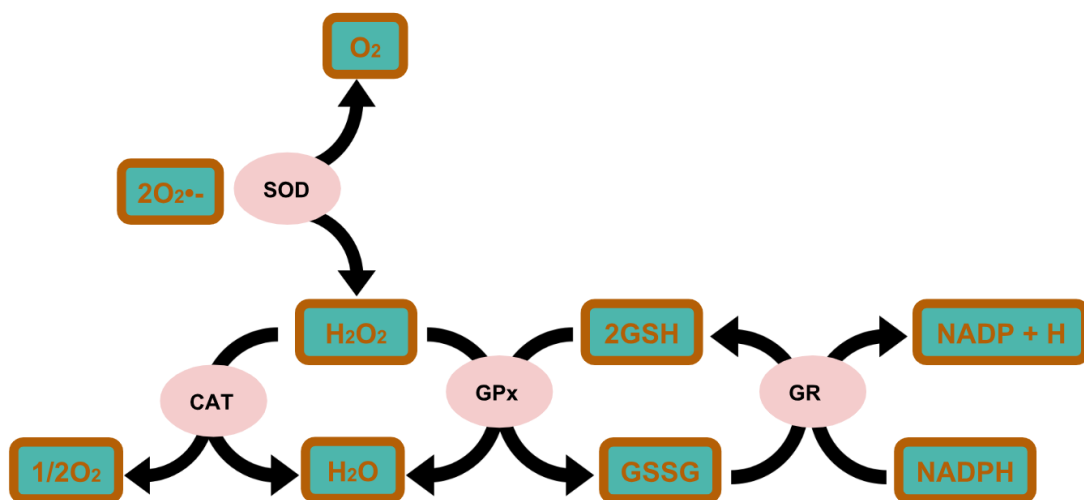


Figura 4. Defesas antioxidantes enzimáticas. (Fonte: adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007.)

Os antioxidantes não enzimáticos compreendem as proteínas ligantes de metal, como a transferrina e a ferritina, que diminuem a disponibilidade de pró-oxidantes, as vitaminas, como o ácido ascórbico e o alfatocoferol, a albumina, a carnitina, a bilirrubina, a GSH - uma das principais defesas antioxidantes não enzimáticas do organismo - dentre outros (Halliwell e Gutteridge, 2007; Schafer et al., 2001).

As formas de proteção dos antioxidantes no organismo contra os RL são diversas, incluindo a remoção do oxigênio presente no meio, o sequestro ou a inibição da geração das espécies reativas. Além disso, pode haver a quelatção de

íons metálicos pelas proteínas transportadoras, o reparo do DNA por meio de enzimas específicas e a degradação de proteínas danificadas pelo mecanismo de ubiquitina-proteossomo (Halliwell, 1994; Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.5 Estresse Oxidativo

O nosso organismo, em condições fisiológicas, está em equilíbrio entre a produção e a degradação de RL, existentes em baixas concentrações nos tecidos (Wulf, 2001). Em situações onde haja um desbalanço entre as defesas antioxidantes e a formação de espécies reativas, em favor destas, ocorre o estresse oxidativo, que pode ser caracterizado tanto pela diminuição das defesas antioxidantes quanto pelo aumento na concentração das espécies reativas (figura 5). O quadro de estresse pode promover adaptação ou dano e morte celular, dependendo do nível do desbalanço (Halliwell e Gutteridge, 2007). Quando ocorre um estresse oxidativo moderado, a célula é capaz de tolerar e de se adaptar, geralmente por uma *upregulation* da síntese dos sistemas de defesa que restaura o equilíbrio oxidante/antioxidante. Quando ocorre um estresse oxidativo severo, a célula sofre dano em várias biomoléculas que pode até levar à morte celular. A morte celular pode ocorrer por necrose ou por apoptose. No primeiro caso, há o inchamento e o rompimento da célula, com liberação do seu conteúdo para o meio extracelular, inclusive liberação de antioxidantes, como a CAT e a GSH, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e as proteínas do grupo HEME, que podem afetar as células adjacentes e promover um estresse oxidativo a elas. No caso de apoptose, o mecanismo intrínseco de morte celular programada é ativado e não há liberação do conteúdo para o meio extracelular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

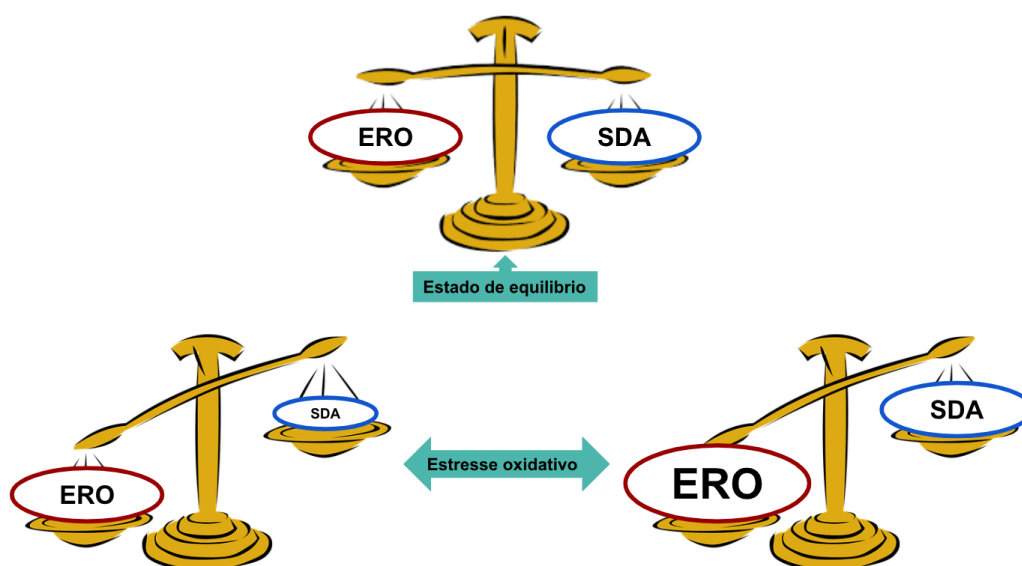


Figura 5. Estados de equilíbrio e de desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e o sistema de defesa antioxidante (SDA). (Fonte: adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007.)

Alguns trabalhos demonstraram uma participação do estresse oxidativo na fisiopatologia de outros EIM, como as aminoacidopatias e as acidemias orgânicas (Guerreiro et al., 2018; Mescka et al., 2015; Deon et al., 2015; Dos Santos Mello et al., 2015). Os danos ocasionados pelos RLs em doenças neurodegenerativas são ainda mais prejudiciais, pois o cérebro é um órgão mais suscetível à ação dessas substâncias em função da sua baixa quantidade de defesas antioxidantes, do seu alto conteúdo de lipídeos nas membranas e do seu alto consumo de energia e de oxigênio em relação a outros tecidos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.6 Dano ao DNA

As EROs podem causar danos ao DNA de forma indireta como, por exemplo, $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 que danificam o DNA pela interação com metais de transição,

principalmente cobre e ferro, na reação de Haber-Weiss, e forma o radical $\text{OH}\cdot$, considerado o mais lesivo dos RLs e este ataca as bases do DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007. Cooke et al., 2006). As células desenvolveram, ao longo da evolução, diferentes mecanismos de reparo que protegem o DNA dos danos causados, porém, se há falha destes mecanismos, efeitos severos podem ocorrer a essas células, dentre eles as mutações e as deleções, e conseqüentemente, neoplasias e mesmo morte celular (figura 6) (Moraes et al., 2012). Em vários EIM, como a Doença da Urina do Xarope do Bordo, a Adrenoleucodistrofia Ligada ao Cromossomo X e a Acidúria glutárica tipo I, foram identificados danos ao DNA induzidos pelos metabólitos acumulados nas doenças (Mescka et al., 2015; Marchetti et al., 2015; Guerreiro et al., 2018).

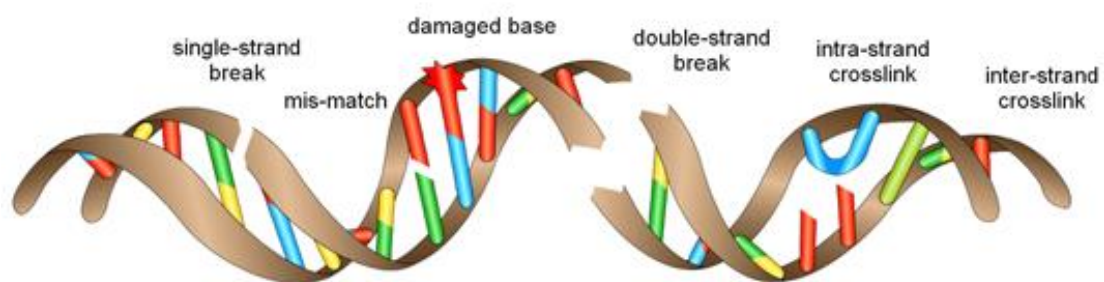


Figura 6. Tipos de dano ao DNA. (Fonte/ <https://sites.google.com/site/bi6101dnarepair/damage-detection-response/types-of-dna-damage>)

O ensaio cometa alcalino é uma técnica descrita por Singh e colaboradores em 1988 que tem como objetivo medir o índice de dano ao DNA, resultante de sua fragmentação. Nas células lesionadas, os fragmentos de DNA migram para fora do núcleo celular e formam um tipo de cauda cometa, que é proporcional ao índice de dano. As células que não apresentam lesões no DNA permanecem com o núcleo

intacto. Muitos estudos *in vitro* têm utilizado o teste do cometa, devido ao tamanho e processamento de amostras mais vantajoso em relação a outras técnicas. Outra forma de identificar dano ao DNA e também ao RNA é pela medida das espécies oxidadas de guanina, como a 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, a 8-hidroxiguanosina e a 8-hidroxiguanina, que são biomarcadores de dano oxidativo. Essa técnica se baseia em ELISA competitivo entre a 8-OHdG livre na amostra e o conjugado 8-OHdG-acetilcolinesterase para um número limitado de sítios de ligação. A intensidade de cor amarela, resultante da reação enzimática após a adição do substrato da acetilcolinesterase, é inversamente proporcional à quantidade de 8-OHdG na amostra (Pradelles, Grassi e Maclouf, 1085).

1.7 L-carnitina

A L-carnitina (ácido 4-N-trimetilamônio-3-hidróxi-butírico) é uma molécula endógena polar de baixo peso molecular (figura 7), com importante papel fisiológico no transporte de ácidos graxos de cadeia longa do citoplasma para o interior da mitocôndria, onde eles serão oxidados e formarão energia na forma de ATP (Bremer, 1983). Este composto é muito utilizado no tratamento de acidemias orgânicas, pois ele tem função detoxificadora, promovendo a remoção de grupamentos acil acumulados, pela ação da enzima carnitina aciltransferase que catalisa a formação de ésteres de carnitina e restaura a concentração de CoA livre na mitocôndria (Hoppel, 2003). As doses variam entre 100 a 200 mg/kg/dia, via oral ou intravenosa, de acordo com a idade do paciente e com o seu estado metabólico (Walter, 2003).

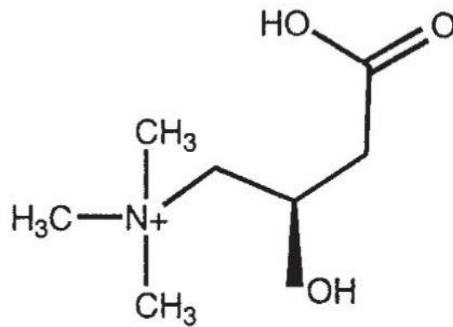


Figura 7. Estrutura química da L-carnitina. (Fonte: <https://www.nature.com/articles/4000805>)

O nosso organismo obtém aproximadamente 75% da L-carnitina por fontes exógenas, que incluem produtos de origem animal como carne vermelha, ovos e laticínios, e outra parte pela biossíntese endógena a partir de aminoácidos precursores, lisina e metionina, no fígado, nos rins e no cérebro. Em média, os valores de referência para indivíduos saudáveis no sangue para a carnitina livre é de 40-50 $\mu\text{mol/L}$ e para a carnitina total é de 60-70 $\mu\text{mol/L}$ (Bremer, 1983; Hoppel, 2003).

Alguns estudos recentemente demonstraram que, além da importante função em processos bioenergéticos, a L-carnitina apresenta efeitos antioxidantes e antiperoxidativos em algumas doenças com comprometimento metabólico, como os EIM (Mescka et al., 2015; Guerreiro et al., 2018). Dentre os mecanismos envolvidos propostos, está a ação sequestradora - *scavenger* - de EROs como o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, a capacidade de quelar íons Fe^{2+} , que evita a formação de espécies reativas através da reação de Fenton, e o efeito estabilizador de dano em membranas celulares (Reznick et al., 1992; Muthuswamy et al., 2006).

1.8 Estresse Oxidativo nos Defeitos da Oxidação de Ácidos Graxos

Estudos recentes em modelo animal observaram os efeitos *in vitro* de ácidos acumulados nos defeitos da oxidação de ácidos graxos (FAOD). Foi demonstrado por Tonin et al. (2010) e Schuck et al. (2009) que os ácidos 3-hidroxi-decanoico (3HDA), 3-hidroxi-tetradecanoico (3HTA) e 3-hidroxi-palmitico (3HPA), acumulados na LCHADD, induziram lipoperoxidação, verificado pelo aumento dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, podendo levar a alterações de integridade, fluidez, permeabilidade e perda funcional de biomembranas. Adicionalmente, este estudo observou aumento na formação de carbonilas e diminuição do conteúdo de sulfidrilas, que são biomarcadores de dano proteico, pelos 3HTA e 3HPA. Estes ácidos também reduziram os níveis de glutatona, uma das principais defesas celulares contra o dano oxidativo e regulação da homeostase redox. Além disso, os antioxidantes e sequestradores de radicais livres trolox e deferoxamina foram capazes de prevenir parcialmente o dano oxidativo a lipídeos, enquanto a deferoxamina preveniu totalmente a redução dos níveis de glutatona induzido pelo 3HTA (Tonin et al., 2010). Outro trabalho demonstrou que os ácidos octanoico (OA) e decanoico (DA), acumulados na MCADD, aumentaram os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e diminuíram as defesas antioxidantes não-enzimáticas, mensuradas pela diminuição da capacidade antioxidante total. DA também elevou o conteúdo de carbonilas e a oxidação de grupos sulfidrilas e reduziu os níveis de glutatona, indicando o poder oxidante destes ácidos (Schuck et al., 2009).

Em relação aos parâmetros de homeostase energética, foi verificado que 3HDA, 3HTA e 3HPA aumentaram o estado 4 da respiração mitocondrial e reduziram a razão de controle respiratório; apenas 3HTA reduziu o estado 3. Além

disso, 3HTA e 3HPA diminuíram o potencial de membrana e os níveis de NAD(P)H da matriz; os compostos OA e DA elevaram o estado 4 da respiração e reduziram o estado 3, assim como a razão de controle respiratório, o potencial de membrana mitocondrial e os níveis de NAD(P)H da matriz. Estes metabólitos também diminuíram a razão ADP/O e as atividades dos complexos da cadeia respiratória, evidenciando a ação de desacopladores da fosforilação oxidativa e de inibidor metabólico destes ácidos (Tonin et al., 2010; Schuck et al. 2009).

Em um estudo com pacientes portadores da MCADD, foram observados valores aumentados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no plasma e foi identificado que o conteúdo de sulfidril plasmática - inversamente relacionada ao dano proteico - estava diminuído em pacientes com MCADD. Além disso, o status antioxidante total estava aumentado no plasma de pacientes bem como a atividade das enzimas SOD e CAT em eritrócitos. Esses dados demonstram que a geração dos radicais livres é possivelmente um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessa doença (Derks et al., 2014). Outro trabalho com pacientes portadores da MADD responsivos à riboflavina demonstrou que fibroblastos de pacientes apresentaram um maior nível de estresse oxidativo, analisados por citometria de imagem utilizando MitoSOX, uma sonda fluorescente vermelha para superóxido molecular mitocondrial (Cornelius et al., 2013). As consequências de níveis elevados de EROs nos fibroblastos destes pacientes incluem a inibição da fusão mitocondrial com aumentado fracionamento e mitofagia, além de um *shift* no metabolismo energético e uma expressão diminuída das enzimas da beta-oxidação de ácidos graxos, indicando que estes pacientes sofrem de uma disfunção mitocondrial geral, como um mecanismo de resgate para as células escaparem da apoptose resultante do estresse oxidativo (Cornelius et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar os parâmetros oxidativos e nitrosativo em urina de pacientes portadores das deficiências de LCHAD, MCAD e MADD no momento do diagnóstico; e verificar, também, o efeito *in vitro* dos metabólitos ácido adípico, ácido subérico, hexanoilglicina, suberilglicina, bem como o efeito da L-carnitina sobre o dano ao DNA.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar a peroxidação lipídica em amostras de urina de pacientes portadores das deficiências de LCHAD, MCAD e MADD no momento do diagnóstico pela dosagem de 8-isoprostanos;
- b. Avaliar o dano ao DNA e ao RNA em amostras de urina de pacientes portadores das deficiências de LCHAD, MCAD e MADD no momento do diagnóstico pela dosagem de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina;
- c. Avaliar o estresse nitrosativo em amostras de urina de pacientes portadores das deficiências de LCHAD, MCAD e MADD no momento do diagnóstico pela dosagem de nitritos e nitratos;
- d. Avaliar o dano ao DNA *in vitro* induzido pelos metabólitos ácido adípico, ácido subérico, hexanoilglicina e suberilglicina, isoladamente e conjuntamente, em leucócitos de indivíduos saudáveis;

- e. Verificar o efeito *in vitro* da co-incubação dos metabólitos ácido adípico, ácido subérico, hexanoilglicina e suberilglicina, isoladamente e conjuntamente, com L-carnitina sobre o dano ao DNA, em leucócitos de indivíduos saudáveis.

3. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação de mestrado serão apresentados na forma de artigo científico.

3.1 Capítulo 1 - Artigo 1: Oxidative Damage in Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency and Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency patients and the *in vitro* effect of L-carnitine on DNA damage induced by the metabolites adipic acid, suberic acid, hexanoylglycine and suberylglycine

Este artigo foi submetido ao periódico *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.

Title: Oxidative Damage in Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency and Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency patients and the *in vitro* effect of L-carnitine on DNA damage induced by the metabolites adipic acid, suberic acid, hexanoylglycine and suberylglycine

Authors: Maira Silmara de Moraes ^{1,2*}, Gilian Guerreiro^{2,4}, Ângela Sitta², Daniella de Moura Coelho², Vanusa Manfredini⁵, Moacir Wajner^{1,2}, Carmen Regla Vargas^{1,2,3,4*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

²Serviço de Genética Médica, HCPA,UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

³Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

Authors e-mails:mairamoraes18@gmail.com; gilian_guerreiro@hotmail.com; asitta@hcpa.edu.br; dcoelho@hcpa.edu.br; vanusa_manfredini@yahoo.com.br; mwajner@ufrgs.br; crvargas@hcpa.edu.br.

***Corresponding authors at:** Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, ZIP CODE 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: +55 51 33598011

Telefax: +55 51 33598010

E-mail addresses:crvargas@hcpa.edu.br (C.R. Vargas), mairamoraes18@gmail.com (M.S. Moraes)

Abstract

The mitochondrial fatty acids oxidation disorders (FAOD) are inherited metabolic disorders (IMD) characterized by the accumulation of fatty acids of different sizes of chain according to the affected enzyme and several mutations compromising the encoding of the dehydrogenases responsible for the mitochondrial oxidation were identified. This study aimed to evaluate the lipid peroxidation by the measurement of 8-isoprostanes, nitrosative stress parameters by the measurement of nitrite and nitrate content and the DNA and RNA oxidative damage by the measurement of oxidized guanine species in urine samples from long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) and multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) patients. Also, we aimed to analyse the *in vitro* DNA damage by comet assay induced by adipic acid, suberic acid, hexanoylglycine and suberylglycine, separated and together, as well as the effect of L-carnitine in human leukocytes. A significant increase on 8-isoprostanes levels in all groups of patients was observed. The nitrite and nitrate levels were significantly increased in LCHADD patients. DNA and RNA damage evaluation revealed significant increase on oxidized guanine species levels in LCHADD and MADD patients. The *in vitro* evaluation revealed a significant increase on the DNA damage induced by all metabolites, besides a potencialized effect. L-carnitine decreased significantly the DNA damage induced by the metabolites. These results demonstrate that toxic metabolites accumulated could be related to the increased oxidative and nitrosative stress of FAOD patients and that the metabolites, separated and together, cause DNA damage, which was reduced by L-carnitine, demonstrating antioxidant protection.

Keywords: MCADD, LCHADD, MADD, oxidative stress, DNA damage, L-carnitine.

1. Introduction

The fatty acid oxidation disorders (FAOD) are inherited metabolic disorders (IMD) caused by the deficiency of specific enzyme activities that are involved in the mitochondrial catabolism of these fatty acids and include different types of mutations. These disorders lead to the accumulation of fatty acids according to the damaged enzyme and compromise this alternative source of energy [1].

Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) is an autosomal recessive disorder that accumulates medium-chain fatty acids like suberic, adipic, sebacic, octanoic and 5-hydroxyhexanoic acids, as well as phenylpropionilglycine, hexanoylglycine and suberylglycine and their carnitine derivatives, and it is the most common disorder of the FAOD. The worldwide prevalence for this disease is 1:14,600 and the presentation occurs 3 to 24 months after birth. MCADD is caused by mutations in the ACADM gene, responsible for the protein encoding [2,3].

Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD) is also an autosomal recessive disorder that accumulates long-chain fatty acids with a hydroxy group like 3-hydroxytetradecanoic, 3-hydroxyhexadecanoic, 3-hydroxyoctadecanoic, adipic, suberic, sebacic, 3-hydroxysebacic, 3-hydroxydehydrosebacic, 3-hydroxydodecanedioic acids and their carnitine derivatives. The estimated worldwide prevalence is 1:250,000 and this disease presents a poor prognosis with most patients presenting a severe phenotype in neonatal period. LCHADD is caused by mutations in the HADHA gene, located at the catalytic site of the protein domain [2,4].

Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) also known as Glutaric Aciduria type 2 (GA-II) is another autosomal recessive disorder that results of the deficiency of electron transfer flavoprotein (ETF alfa and beta) and electron transfer

flavoprotein/ubiquinone oxidoreductase (ETF/QO) or electron transfer flavoprotein/dehydrogenase (ETF/DH) that transport the electrons flow from beta-oxidation to the respiratory chain. Several metabolites are accumulated including dicarboxylic acids, glutaric, ethylmalonic, 2-hydroxyglutaric, adipic, suberic, sebacic acids, glycine conjugates and their carnitine derivatives. The worldwide prevalence for this disease is 1:200,000 and it has three clinical phenotypes: I - neonatal with congenital anomalies; II - neonatal without congenital anomalies (severe forms) that present generally within the first 48 hours of life and might be fatal; III - mild and late form that presents in the first months until adult life with broad clinical spectrum and better prognosis [2,5].

All disorders above share common clinical and biochemical features like hypoketotic hypoglycemia, metabolic acidosis, hypotony, hyperammonemia and in severe cases skeletal myopathy, hypotonia, cardiomyopathy, hepatopathy and neuropathy. Diagnosis of these diseases is based on the identification of urinary excretion of the acids and their carnitine derivatives in blood. The confirmation can be performed by molecular analysis. Currently, the therapeutic strategy is to avoid fasting and to consume high amounts of carbohydrate and low amounts of fat and protein [2,6]. Also, in some cases a supplementation of L-carnitine (L-car) is indicated, specially in patients with carnitine deficiency, due its property of formation of conjugated fatty acids and elimination of toxic metabolites. Doses of L-car vary from 50 to 100 mg/kg/day, according to the patient's age and its metabolic status [7]. Besides the important function on the transport of long-chain fatty acids across the inner mitochondrial membrane for beta-oxidation, L-car also has antioxidant properties, due to the capacity to scavenge hydrogen peroxide and superoxide radical and to chelate transition metal ions with protective effects against oxidative

injury in others IMD like phenylketonuria, glutaric aciduria type I and maple syrup urine disease [8, 9, 10, 11, 12].

Mitochondria are the most important organelles for cell homeostasis through several processes like energy production by the oxidative phosphorylation, that generates ATP and reactive oxygen species (ROS). Biochemical and morphological alterations in tissues of FAOD patients suggest that the mitochondrial dysfunction contributes to the pathogenesis of the diseases. The accumulation of toxic metabolites plus high concentrations of ROS become the environment potentially harmful to the organelle and may result in mitochondrial stress and collapse of internal membrane potential [13, 14]. Although ROS have an essential role on cell functions, an increase on its concentration cause oxidative damage to biomolecules like lipids, proteins, deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA), compromising cell functions like membrane permeability, transport, signalling, enzymatic reactions, mutation repair and gene expression, leading to the cell death [15].

Although many studies have demonstrated that the pathogenesis of FAOD is related to its toxic metabolites, there is not enough knowledge about the pathophysiology of the diseases and their mechanisms are still not completely known [16, 17, 18, 19]. In many others IMD it was demonstrated altered oxidative and nitrate parameters, with increased levels of ROS and reactive nitrogen species (RNS) [10, 11, 12].

This study aimed to investigate oxidative and nitrosative stress parameters in patients affected by LCHADD, MCADD and MADD and also to evaluate the *in vitro* effect of L-carnitine on DNA damage induced by with the main metabolites

accumulated in MCADD: adipic acid (ADI), suberic acid (SUB), hexanoylglycine (HG) and suberylglycine (SG).

2. Materials and Methods

2.1 *In vivo* experiments

2.1.1 Patients and biological samples

We analyzed urine samples from 20 patients - mean age, $6,6 \pm 3,9$ years - from the Medical Genetic Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre affected by FAODs at diagnosis: LCHADD (n=9), MCADD (n=3) and MADD (n=8) for oxidative and nitrative stress parameters. The diagnosis were performed by the analysis of urinary organic acids by gas chromatography coupled to mass spectrometry as well as by detection of blood acylcarnitines accumulation by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. For the control group (n=5), we utilized urine samples of age matched healthy people. All urine samples were stored in a freezer at -80°C and quickly unfreezed for the analysis. The Ethics Committee of HCPA approved this project (2018-0549) and all patients or their parents gave informed consent about this study.

2.1.2 8-Isoprostane determination

8-Isoprostane is a biomarker of lipid peroxidation in urine and was measured by the 8-isoprostane AChE Competitive ELISA commercial kit (Item No.516351; Cayman Chemical). This assay is based on the competition between 8-isoprostane

and an 8-isoprostane-acetylcholinesterase (AChE) conjugate (Tracer) for a limited number of 8-isoprostanes-specific rabbit antiserum binding sites in a 96-wells plate. The Ellman's reagent with the substrate to AChE is added to the wells and the product of this enzymatic reaction has a yellow color that absorbs spectrophotometrically at 412 nm. The intensity of the color is proportional to the amount of tracer bound to the well and is inversely proportional to the amount of free 8-isoprostane present in the samples. Since 8-isoprostanes is rapidly metabolized and excreted in blood and urine, it is considered a well-established biomarker of oxidative stress. Results were expressed as ng of isoprostanes per mg of creatinine.

2.1.3 Reactive Nitrogen Species

The assay was based on the measurement of total nitrate/nitrite concentration, which represent the final products of nitric oxide (NO), in a simple two-step process according to the commercial kit protocol (Item No.780001; Cayman Chemical). The first step is the conversion of nitrate to nitrite utilizing nitrate reductase and the second step is the addition of the Griess reagent that convert nitrite into a purple azo compound that absorbs spectrophotometrically at 540 nm. The intensity of the color is proportional to the NO_2^- concentration in the samples. Results were expressed as μmol per mg of creatinine.

2.1.4 Oxidized Guanine Species determination

Oxidatively damaged guanine species like 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG), 8-hydroxyguanosine and 8-hydroxyguanine are biomarkers for DNA and RNA oxidative damage and were measured by the DNA/RNA oxidative damage

AChE competitive ELISA commercial kit (Item No.589320; Cayman Chemical). This assay is based on the competition between oxidatively damaged guanine species and an 8-OH-dG-acetylcholinesterase conjugate (Tracer) for a limited number of binding sites in a 96-wells plate. The Ellman's reagent with the substrate to AChE is added to the wells and the product of this enzymatic reaction has a yellow color that absorbs spectrophotometrically at 412 nm. The intensity of the color is proportional to the amount of tracer bound to the well and is inversely proportional to the amount of free oxidatively damaged guanine present in the samples. Results were expressed as ng per mg of creatinine.

2.1.5 Creatinine determination

Urinary creatinine was measured by the Creatinine kinetic kit of Bioclin (Ref K067; Quibasa Química Básica Ltda). This assay is based on the reaction of creatinine with picrate alkaline in buffered solution that products a chromogen that absorbs spectrophotometrically at 510 nm. The intensity of the color is proportional to the concentration of creatinine in the samples. Results were expressed in mg/dl.

2.2 *In vitro* experiments

2.2.1 Comet Assay

The alkaline comet assay was performed according to the method described by Singh et al in accordance with general guidelines [20]. Human blood samples from four healthy volunteers were collected in heparinized vials. Leukocytes were incubated with different metabolites of MCAD: Adipic Acid - 3mM; Suberic Acid - 3mM; Hexanoylglycine - 0,5mM; Suberylglycine - 1,5mM, isolated and in

combination, at 37°C for 6 hours. The studied concentrations can be found in the blood of MCADD patients [21]. In order to determine the effects of L-car, leukocytes with each metabolite of MCAD were co-incubated with L-car 60 µM at the same conditions. The concentration of L-car used in this study were based on the supplementation recommended for patients with organic acidemias (50-100 mg/kg/day) [22,23]. Isolated leukocytes were suspended in agarose and spread into a glass microscope slide precoated with agarose and after allowed to set at 4°C for 5 minutes. The slides were incubated in ice-cold lysis solution to remove cell proteins and to leave DNA as nucleoids. Following the lysis procedure, slides were placed on a horizontal electrophoresis unit, covered with fresh buffer (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH>13) for 20 minutes at 4 °C to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile-sites.

Electrophoresis was performed for 20 minutes (25V; 300mA; 0.9V/cm). The slides were neutralized, washed in bidistilled water and stained using a silver staining protocol. The gels were dried at room temperature overnight, and then analyzed using an optical microscope. One hundred cells (25 cells from each of the four replicate slides) were selected to be analyzed. The cells were visually scored according to tail length and received scored from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) and therefore, the damage index (DI) for the cells range from 0 (all the cells with no migration) to 400 (all the cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions at least by two different individuals.

2.3 Statistical analyses

The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and were statistically analyzed using the GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA - version 5.0). For *in vivo* assays with biological samples, comparisons between means were analyzed by unpaired T-test. For *in vitro* comet assay, comparisons were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey multiple range test (two groups; nonparametric). A P value lower than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

Lipid peroxidation was determined by the measurement of 8-isoprostane levels in urine from FAOD patients and controls. It was verified significant increased 8-isoprostane levels in all groups of patients, LCHADD, MADD and MCADD, when compared to the control group (figure 1).

Nitrite and nitrate content that represent RNS production was determined in urine of FAOD patients and controls. It was observed a significant increase of the nitrite and nitrate content in samples of LCHADD patients compared to controls (figure 2). However, no differences were found when comparison were done between MADD patients and controls or between MCADD patients and controls.

The DNA damage was evaluated in urine from FAOD patients and controls by the measurement of oxidized guanine species, like 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG), 8-hydroxyguanosine and 8-hydroxyguanine . When we compared LCHADD patients and control group, a significant difference was found, indicating an increase of this biomarker. The same occurs when MADD patients samples were compared to the controls. Only the MCADD patients group had no statistically significant

difference in oxidized guanine species levels when compared to the control group (figure 3).

The evaluation of the *in vitro* DNA damage was performed by incubating different MCADD metabolites such adipic acid (ADI), suberic acid (SUB), hexanoylglycine (HG) and suberylglycine (SG) with leukocytes of healthy individuals. We observed that all metabolites induced a significant increase in the damage index when compared to the controls (figure 4). Hexanoylglycine (37 arbitrary units) and suberylglycine (46 arbitrary units) presented a higher increase on the damage index when compared to the adipic acid (15 arbitrary units) and suberic acid (12 arbitrary units), even in lower dosis. Also, table 1 show the number of cells found in each damage class at the tested metabolites concentration, obtained from four independent experiments, and it is observed that hexanoylglycine and suberylglycine presented a higher damage class - class 2 -, compared to the adipic and suberic acids - only class 1. We tested, also, the co-incubation with L-car to investigate its effect on DNA damage caused by the MCAD metabolites. Co-incubation with L-car was able to decrease significantly the damage index induced by the metabolites adipic acid, hexanoylglycine, suberylglycine (13 arbitrary units; 29 arbitrary units; 27 arbitrary units, respectively) but not the control levels for the tested concentrations.

We also investigated the incubation of all metabolites in combination, in order to verify if it would occur a potentialized effect. When all metabolites were incubated in combination, it was observed the highest increase on the damage index (51 arbitrary units) when compared to the control (figure 5) and a higher damage class - classes 2 and 3. Co-incubation with L-car was able to decrease significantly the damage index induced by all metabolites in combination (30 arbitrary units) but not to the control levels for the tested concentrations.

4. Discussion

FAO is the main source of energy as acetyl-CoA for the cells during fasting and metabolic stress situations. Thus, MCADD, LCHADD and MADD patients must avoid fasting and high-intensity exercise since this catabolic process is impaired due to the enzymes deficiency and often present hypoketotic hypoglycemia and metabolic acidosis. The fatty acids accumulation in tissues like brain, liver, heart and skeletal muscle is also characteristic of individuals affected by FAOD, since mitochondrial fatty acid beta-oxidation is actively used by these tissues, resulting on the clinical findings as neuropathy, hepatopathy, cardiomyopathy and skeletal myopathy. Moreover, a recent study demonstrated that despite earlier diagnosis by expanded newborn screening, sudden deaths were not avoided and acute decompensations with severe clinical manifestations still occur as well [24, 25].

The accumulated toxic metabolites, according to previous studies, can induce an excessive free radicals production, which in addition to a reduced antioxidant status, lead to oxidative stress in some IMD and plays an important role in their pathophysiology [16, 17]. Although the mechanisms involved remain still unknown, Tonin et al. found that LCHADD metabolites 3-hydroxydodecanoic, 3-hydroxytetradecanoic and 3-hydroxypalmitic acids diminished the mitochondrial membrane potential, the matrix NAD(P)H levels and increased state 4 respiration and decreased state 3 respiration as well as respiratory control ratio, acting as uncouplers of oxidative phosphorylation and metabolic inhibitor and compromising energy homeostasis in mitochondria [18]. Schuck et al. demonstrated similar findings for the MCADD metabolites octanoic and decanoic acids, plus a marked mitochondrial swelling and cytochrome C release from mitochondria, reflecting a permeabilization of the inner mitochondrial membrane that probably contributes to the tissue

dysfunction observed in patients [19]. Cornelius et al. verified inhibition of mitochondrial fusion with increased fractionation and mitophagy in MADD patients fibroblasts, besides a shift in the energy metabolism, indicating a general mitochondria dysfunction as a rescue mechanism for the cells to escape apoptosis as a result of oxidative stress [26].

In the current study, we demonstrated that FAOD patients affected by LCHADD, MCADD and MADD present significantly increased urinary 8-isoprostanes levels, a biomarker of lipid peroxidation, when compared to the control group. Isoprostanes are prostaglandin-like compounds not formed by a cyclooxygenase-dependent oxidation of arachidonic acid, but formed by a free radical-catalysed peroxidation of arachidonic acid esterified in membrane phospholipids. Then, isoprostanes elevated concentrations are lesive and might compromise membrane integrity and fluidity leading to the rupture of organelles like mitochondria and even the rupture of the cells [27, 28]. In fact, others studies with inherited metabolic disorders also demonstrated increased lipid peroxidation. Guerreiro et al. observed increased isoprostanes levels in urine from Glutaric Aciduria type I patients, with high concentrations of accumulated glutaric acid [11]. Mescka et al. found elevated levels of thiobarbituric acid-reactive substances in rats' brain in a chemically-induced acute model of maple syrup urine disease (MSUD), a disorder that accumulates branched-chain amino acids (BCAA) [12]. Schuk et al. demonstrated that medium-chain fatty acids accumulated in MCAD deficiency, octanoate and decanoate (0.5 to 3.0 mM), increased *in vitro* the levels of thiobarbituric acid-reactive substances in rats' brain [16]. Tonin et al. also observed that long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulated in LCHAD deficiency, 3-hydroxydodecanoic, 3-hydroxytetradecanoic and 3-hydroxypalmitic acids increased *in vitro* thiobarbituric acid-reactive substances

measurement in cerebral rat tissue [17]. Derks et al. observed thiobarbituric acid-reactive substances values significantly elevated in plasma of MCAD-deficient patients [29]. Our data demonstrate increased 8-isoprostanes levels in urine of FAOD patients, in accordance with previous studies in animals, and suggest that the accumulation of fatty acids on LCHADD, MADD and MCADD might induce lipoperoxidative damage.

Nitric Oxide (NO) is produced by different types of cells and has many functions like cellular signaling and defense against pathogens through oxidative toxicity. The NO final products are nitrite (NO^{2-}) and nitrate (NO^{3-}) and their levels correspond to a total NO production. A high amount of these molecules may cause nitrosative damage through the formation of RNS like peroxynitrite [30]. Nitrite and nitrate levels were measured in our study to evaluate nitrosative damage to the cells. The increase of the nitrite and nitrate content in urine samples of LCHADD patients indicate that they might be exposed to nitrosative stress caused by the increase in RNS formation, which can lead to proteins nitration and compromise their function. Although it was not found any alteration in this parameter for MADD and MCAD patients when compared to the controls, we can observe a tendency to an increased nitrite and nitrate levels. Perhaps in a future study with a greater number of patients it would be possible to detect statistical significant differences. Tonin et al. found no alteration on nitrite and nitrate production induced *in vitro* by 3-hydroxydodecanoic, 3-hydroxytetradecanoic and 3-hydroxypalmitic acids, contrary to our results [17]. The different results could be attributed possibly to the limitation of the *in vitro* model on the ideal simulation of the complex *in vivo* system or even to the concentration of the acids (10, 25, 50 and 100 μM) utilized on the study. Increased RNS levels in urine samples of Glutaric Aciduria type I patients, disorder characterized by the

accumulation of glutaric acid were found [11]. Jacques et al. identified elevated levels of urinary nitrite and nitrate and plasmatic nitric oxide in mucopolysaccharidosis type II patients, with accumulation of glycosaminoglycans [31]. Our present results suggest that nitrosative stress occurs in LCHADD patients and is probably related with the pathophysiology of this disease.

DNA and RNA are others important target biomolecules that can be damaged by elevated concentrations of ROS, leading to a variety of lesions, such as DNA strand breaks, abasic sites, several species of oxidized purine/pyrimidine and DNA-protein cross-links. Genetic mutations and altered gene expression can occur as a consequence of DNA damage. The hydroxyl radical, the most harmful ROS, and others free radicals can attack nuclear and mitochondrial DNA and generate the oxidized forms of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG), 8-hydroxyguanosine and 8-hydroxyguanine, oxidized guanine species [32]. We detected a significant increase of oxidized guanine species in urine of LCHADD and MADD patients, what indicate DNA and RNA oxidative damage. MCADD patients from our study did not present significant difference in this parameter compared to the control group. However, a tendency to an increased oxidized guanine species levels can be observed and future studies with more patients could clarify this issue. Increased oxidized guanine species in urine samples of Glutaric Aciduria type I patients was demonstrated by Guerreiro et al [11]. Mescka et al. observed a significant increase on DNA damage index in leukocytes of MSUD patients, with high levels of BCAA [12]. The data of our work allow to suggest that the accumulation of toxic metabolites in LCHADD and MADD is involved in the DNA and RNA oxidative damage.

Therefore, the alkaline comet assay, a simple and sensitive technique capable of measure single and double DNA strand breaks, was performed in order to

investigate the *in vitro* effect of the main MCADD metabolites (adipic acid, suberic acid, hexanoylglycine and suberylglycine) upon DNA damage as well as to study the effect of L-car. It was verified that adipic and suberic acids induced significantly elevated levels of DNA damage, with a DI of 15 and 12 arbitrary units, respectively. These metabolites presented only slightly damaged cells (class 1, the lowest level of DNA injury). Co-incubation with L-car significantly decreased DI caused by adipic acid but not by suberic acid, at the concentration of 60 μ M. Hexanoylglycine and suberylglycine presented, interestingly, higher damaged cells (class 2) and significantly increased DI (37 and 46 arbitrary units, respectively), indicating greater DNA migration, and co-incubation with L-car (60 μ M) also reduced significantly the DI caused by both metabolites but not to the control levels. The *in vitro* effect on DNA damage of the four metabolites in combination was the highest (51 arbitrary units), representing the greatest DNA migration and demonstrating a potentialized effect of the metabolites. Co-incubation with L-car (60 μ M) also prevented DNA damage induced by adipic acid, suberic acid, hexanoylglycine and suberylglycine in combination, but not to the control levels for the tested concentrations. If not repaired, this type of damage, caused by direct DNA mechanisms or by activation of Ca²⁺-endonucleases and by interfering with enzymes of DNA replication and repair, may lead to serious consequences in the genome, like loss of heterozygosity, microsatellite instability, mutations or neoplastic growth [32].

The treatment of several IMDs include L-car supplementation, due to a secondary deficiency caused by the restricted diet and recent studies have demonstrated antioxidant properties of the molecule [11,12]. L-car prescription is recommended for MCADD patients exhibiting a deficiency in plasma carnitine, besides the avoidance of prolonged fast, according to the french consensus for

neonatal screening, diagnosis and management [33]. In our study, L-car decreased *in vitro* the DNA damage induced by adipic acid, hexanoylglycine and suberylglycine, isolated and in combination. The protective effects of L-car are mainly attributed to its ability to scavenge ROS and to chelate transition metal ions [8]. Furthermore, L-car is capable to reduce oxidative damage to DNA caused by alkylating agents and free radicals, accelerating the disappearance of single-strand breaks and the repair action of poly(ADP-ribose)polymerase or other related mechanisms [34]. Another mechanism of L-car protection could be related to its conjugation to the toxic metabolites in IMD forming their carnitine derivatives [35]. Guerreiro et al. reported that L-car attenuated the *in vitro* DNA damage caused by glutaric acid at concentrations of 0.5, 3 and 6 mM in a concentration-dependent effect [11]. Mescka et al. identified reduced DNA damage in MSUD patients after 1 and 2 months of L-car supplementation compared to MSUD patients before treatment [12]. These data plus the findings of our work corroborate to the evidences of the antioxidant role of L-carnitine.

5. Conclusion

In conclusion, our data indicate that LCHADD, MADD and MCADD patients presented lipoperoxidation, LCHADD patients presented nitrosative stress and LCHADD and MADD patients presented DNA and RNA oxidative damage, what is probably related to the pathophysiology of these disorders. However, more studies are necessary to understand the mechanisms by which the damage occurs. In addition, our present study demonstrates that accumulated MCADD toxic metabolites (adipic acid, suberic acid, hexanoylglycine and suberylglycine) induce, isolatedly and in combination, DNA damage, presenting a potentialized effect. L-car was capable to

decrease DNA of this damage, evidencing the protective properties on DNA injury and its potential as an adjuvant therapy for FAOD.

6. Acknowledgments

This study was supported by grants from CAPES, CNPq and FIFE/HCPA-Brazil. The authors are also grateful for the collaboration of patients and their families and the SGM/HCPA staff.

7. Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest in this work.

8. References

1. Wanders RJ, Vreken P, den Boer ME, Wijburg FA, van Gennip AH, IJlst L. Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis.* (1999) 22: 442–487. DOI.org/10.1023/A:1005504223140
2. Scriver C, Beaudt A, Sly W, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* (2001) 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill.
3. Touma EH, Charpentier C. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child.* (1992) 67(1): 142–5. DOI: 10.1136/adc.67.1.142.
4. Lindner M, Hoffmann GF, Matern D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *J Inherit Metab Dis.* (2010) 33(5): 521–6. DOI: 10.1007/s10545-010-9076-8.

5. Frerman FE and Goodman SI. Deficiency of electron transfer flavoprotein or electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase in glutaric acidemia type II fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1985) 82 (13): 4517–4520. DOI.org/10.1073/pnas.82.13.4517.
6. Pennisi EM, Garibaldi M, Antonini G. Lipid Myopathies. *J. Clin. Med.* (2018) 7 (12) DOI: 10.3390/jcm7120472.
7. Vasiljevski ER, Summers MA, Little DG, Schindeler A. Lipid storage myopathies: Current treatments and future directions. *Prog Lipid Res.* (2018) 72: 1-17. DOI: 10.1016/j.plipres.2018.08.001.
8. Bahl J, Bressler J. The pharmacology of carnitine. *Pharmacology.* (1989) 337: 118-284. DOI:10.1146/annurev.pa.27.040187.001353
9. Gulcin I. Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Sci.* (2006) 78: 803-811. DOI:10.1016/j.lfs.2005.05.103.
10. Deon M, Sitta A, Faverzani JL, Guerreiro GB, Donida B, Marchetti DP, et al. Urinary biomarkers of oxidative stress and plasmatic inflammatory profile in phenylketonuric treated patients. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev Neurosci.* (2015) 47: 259–265. DOI: 10.1016/j.ijdevneu. (2015).10.001.
11. Guerreiro G, Faverzani J, Jacques CED, Marchetti DP, Sitta A, Coelho DM, Kayser A, Kok F, Athayde L, Manfredini V, Wajner M, Vargas, CR. Oxidative damage in glutaric aciduria type I patients and the protective effects of l-carnitine treatment. *J. Cell. Biochem.* (2018) 119: 10021–10032. DOI: 10.1002/jcb.27332.
12. Mescka CP, Guerreiro G, Hammerschmidt T, Faverzani J, Coelho DM, Manfredini V, Wayhs CAY, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas, CR. L-Carnitine

- supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients. *Mutat Res.* (2015) 775: 43–47. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.(2015).03.008.
13. Kroemer G and Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* (2000) 6: 513–519. DOI:0.1038/74994.
14. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol. Med.* (2009) 47: 333–343. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004.
15. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and Medicine. Oxford University Press. (2007) 4th. ed.
16. Schuck PF, Ferreira GC, Moura, AP, Busanello ENB, Tonin AM, Dutra-Filho CS, Wajner M. Medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency elicit lipid and protein oxidative damage and decrease non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain. *Neurochem. Int.* (2009) 54: 519–525. DOI:10.1016/j.neuint.2009.02.009.
17. Tonin AM, Grings M, Busanello EN, Moura AP, Ferreira GC, Viegas CM, Fernandes CG, Schuck PF, Wajner M. Long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in LCHAD and MTP deficiencies induce oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int.* (2010) 56: 930–936. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.03.025.
18. Tonin AM, Ferreira GC, Grings M, Viegas CM, Busanello EN, Amaral AU, Zanatta A, Schuck PF, Wajner M. Disturbance of mitochondrial energy homeostasis caused by the metabolites accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain. *Life Sci.* (2010) 86: 825–831. DOI:10.1016/j.lfs.2010.04.003.
19. Schuck PF, Ferreira GC, Tonin, AM, Viegas CM, Busanello ENB, Moura AP, Zanatta A, Klamt F, Wajner M. Evidence that the major metabolites

- accumulating in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency disturb mitochondrial energy homeostasis in rat brain. *Brain Res.* (2009) 1296: 117–126. DOI:10.1016/j.ijdevneu.2012.03.238.
20. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* (1988) 175: 184-191. DOI.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0.
21. Fontella FU, Pulrolnik V, Gassen E, Wannmacher CMD, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport.* (2000) 11(3): 541–544. DOI: 10.1097/00001756-200002280-00023.
22. De Assis DR, Maria RC, Ferreira GC, Schuck PF, Latini A, Dutra-Filho CS, Wannmacher CMD, Wyse ATS, Wajner M. Na⁺, K⁺ ATPase activity is markedly reduced by cis-4-decenoic acid in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. *Experimental Neurology.* (2006) 197(1): 143–149. DOI: 10.1016/j.expneurol.2005.09.002.
23. Evangelidou A, Vlassopoulos D. Carnitine metabolism and deficit — when supplementation is necessary? *Curr. Pharm. Biotechnol.* (2003) 4 (3): 211–219. DOI: 10.2174/1389201033489829.
24. Wajner M, Amaral AU. Mitochondrial dysfunction in fatty acid oxidation disorders: insights from human and animal studies. *Biosci Rep.* (2015) 36(1): e00281. DOI 10.1042/BSR20150240.
25. Janeiro P, Jotta R, Ramos R, Florindo C, Ventura FV, Vilarinho L, Almeida, IT, Gaspar A. Follow-up of fatty acid β -oxidation disorders in expanded newborn screening era. *Eur J Pediatr.* (2019) 178: 387-394. DOI.org/10.1007/s00431-018-03315-2.

26. Cornelius N, Corydon TJ, Gregersen N, Olsen RKJ. Cellular consequences of oxidative stress in riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency patient fibroblasts. *Human Molecular Genetics*, (2014) 23(16): 4285–4301. DOI.org/10.1093/hmg/ddu146.
27. Morrow JD, Harris TM, Roberts, LJ. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal. Biochem.* (1990) 184: 1-10. DOI.org/10.1016/0003-2697(90)90002-Q.
28. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* (1991) 11: 81-128. DOI.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6.
29. Derks TG, Touw CM, Ribas GS, Biancini GB, Vanzin CS, Negretto G, Mescka CP, Reijngoud DJ, Smit GP, Wajner M, Vargas CR. Experimental evidence for protein oxidative damage and altered antioxidant defense in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* (2014) 37: 783–789. DOI: 10.1007/s10545-014-9700-0.
30. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet.* (1994) 343: 1199–1206. DOI.org/10.1016/S0140-6736(94)92405-8.
31. Jacques CE, Donida B, Mescka CP, Rodrigues DG, Marchetti DP, Bitencourt FH, Burin MG, de Souza CF, Giugliani R, Vargas CR. Oxidative and nitrative stress and pro-inflammatory cytokines in Mucopolysaccharidosis type II patients: effect of long-term enzyme replacement therapy and relation with glycosaminoglycan accumulation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. basis Dis.*, (2016) 1862: 1608-1616. DOI 10.1016/J.BBADIS.2016.05.021

32. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* (2003) 17: 1195-1214. DOI:10.1096/fj.02-0752rev.
33. Feillet F, Ogier H, Cheillan D, Aquaviva C, Labarthe F, Baruteau J, Chabrol B, de Lonlay P, Valayanopoulos V, Garnotel R, Dobbelaere D, Briand G, Jeannesson E, Vassault A, Vianey-Saban C. SFEIM (Société française pour l'étude des erreurs innées du métabolisme). Medium-chain acyl-CoA-dehydrogenase (MCAD) deficiency: French consensus for neonatal screening, diagnosis, and management. *Arch Pediatr.* (2012) 19(2): 184-93. DOI: 10.1016/j.arcped.2011.10.025.
34. Boerrigter ME, Franceschi C, Arrigoni-Martelli E, Wei JY, Vijg J. The effect of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the disappearance of DNA single-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis.* (1993) 14: 2131–2136. DOI:10.1093/carcin/14.10.2131.
35. Garcia CL, Filippi S, Mosesso P, Calvani M, Nicolai R, Mosconi L, Palitti F. The protective effect of L-carnitine in peripheral blood human lymphocytes exposed to oxidative agents. *Mutagenesis.* (2006) 21: 21–27. DOI:10.1093/mutage/gei065.

Figure Legends:

Figure 1. 8-isoprostane levels in urine from (A) LCHADD patients, n=9, (B) MADD patients, n=8, and (C) MCADD patients, n=3, compared to controls. Data are expressed as mean \pm SEM. * indicates $P < 0.05$ (Student's t T-test for unpaired samples) compared to the control group.

Figure 2. Nitrite and Nitrate levels in urine from (A) LCHADD patients, n=9, (B) MADD patients, n=8, and (C) MCADD patients, n=3, compared to controls, n=5. Data are expressed as mean \pm SEM. * indicates $P < 0.05$ (Student's t T-test for unpaired samples) compared to the control group.

Figure 3. Oxidized guanine species levels in urine from (A) LCHADD patients, n=9, (B) MADD patients, n=8, and (C) MCADD patients, n=3, compared to controls, n=5. Data are expressed as mean \pm SEM. * indicates $P < 0.05$ (Student's t T-test for unpaired samples) compared to the control group.

Figure 4. DNA damage index induced by medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency metabolites and L-car effect. (A) *In vitro* effect of adipic acid (3mM) co-incubated with L-car (60 μ M) on DNA damage in leukocytes from whole blood. (B) *In vitro* effect of suberic acid (3mM) co-incubated with L-car (60 μ M) on DNA damage in leukocytes from whole blood. (C) *In vitro* effect of hexanoylglycine (0,5mM) co-incubated with L-car (60 μ M) on DNA damage in leukocytes from whole blood. (D) *In*

in vitro effect of suberylglycine (1,5mM) co-incubated with L-car (60µM) on DNA damage in leukocytes from whole blood. Data are expressed as mean ± SEM of four independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey multiple range test. * indicates statistical difference compared to the control. # indicates statistical difference compared to the metabolite group. P<0.05.

Figure 5. *In vitro* effect of adipic acid (3mM), suberic acid (3mM), hexanoylglycine (0,5mM), suberylglycine (1,5mM) co-incubated with L-car (60µM) on DNA damage in leukocytes from whole blood. Data are expressed as mean ± SEM of four independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey multiple range test. * indicates statistical difference compared to the control. # indicates statistical difference compared to the metabolite group. P<0.05.

Figure 1:

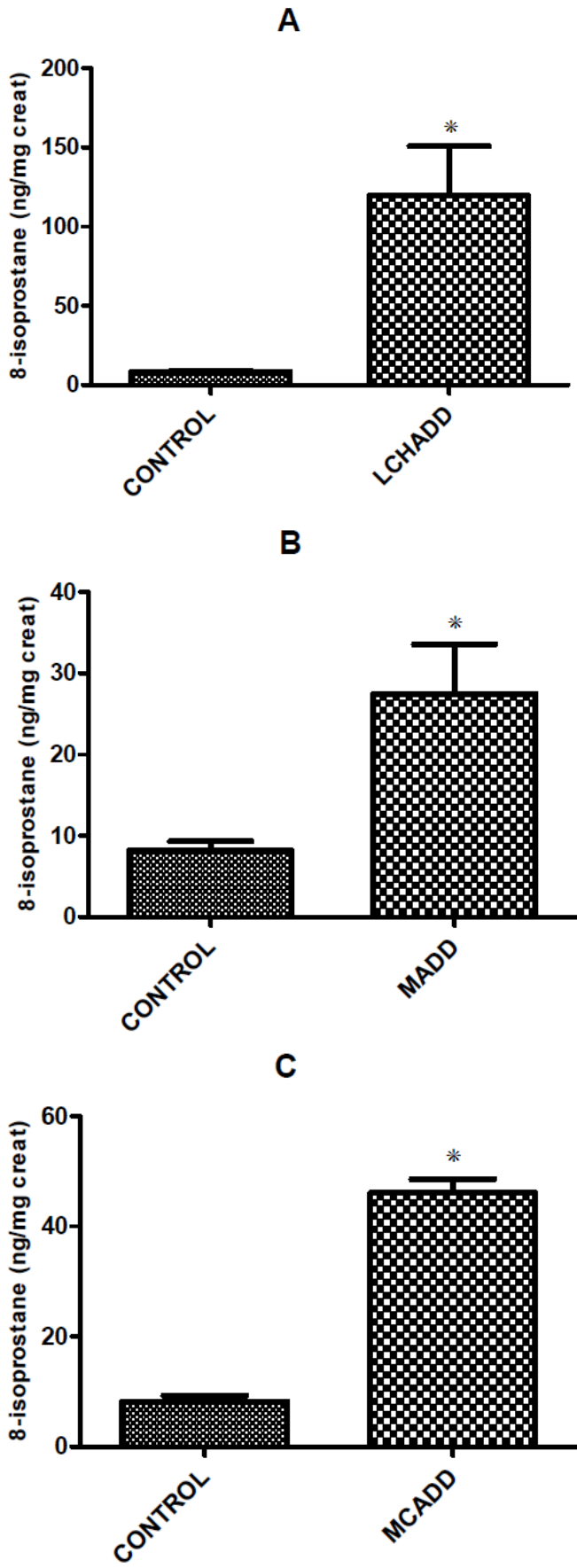


Figure 2:

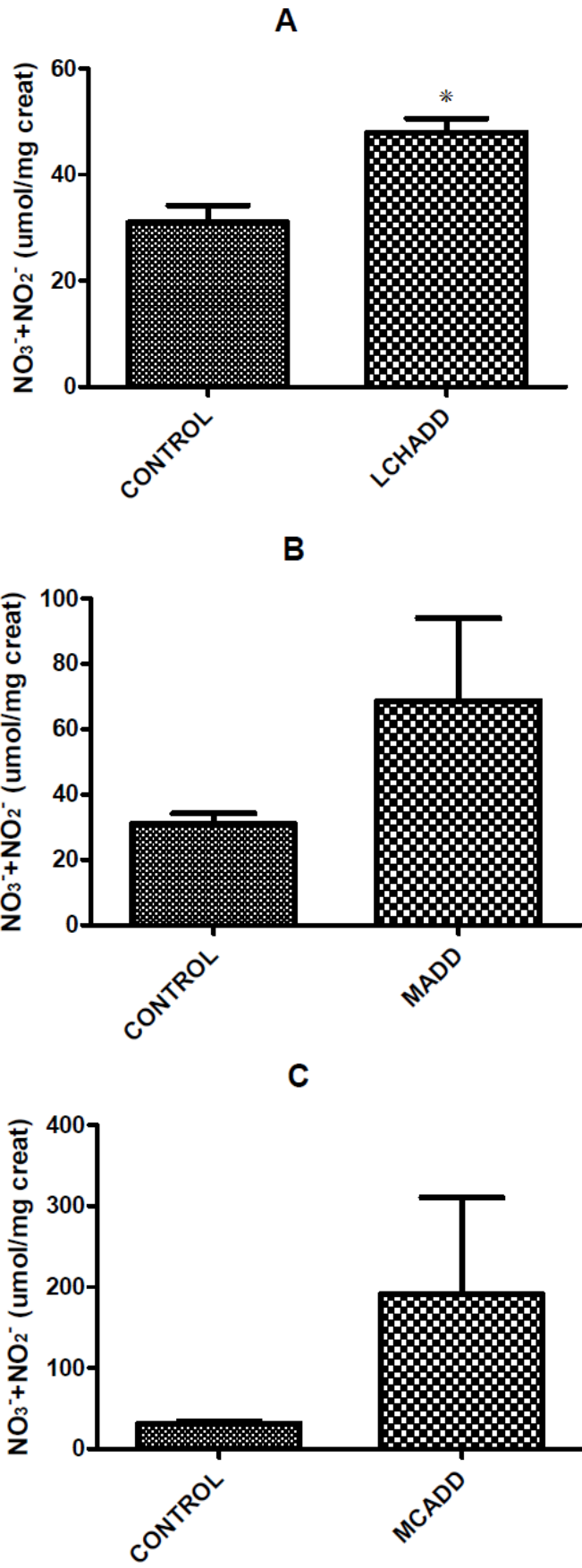


Figure 3:

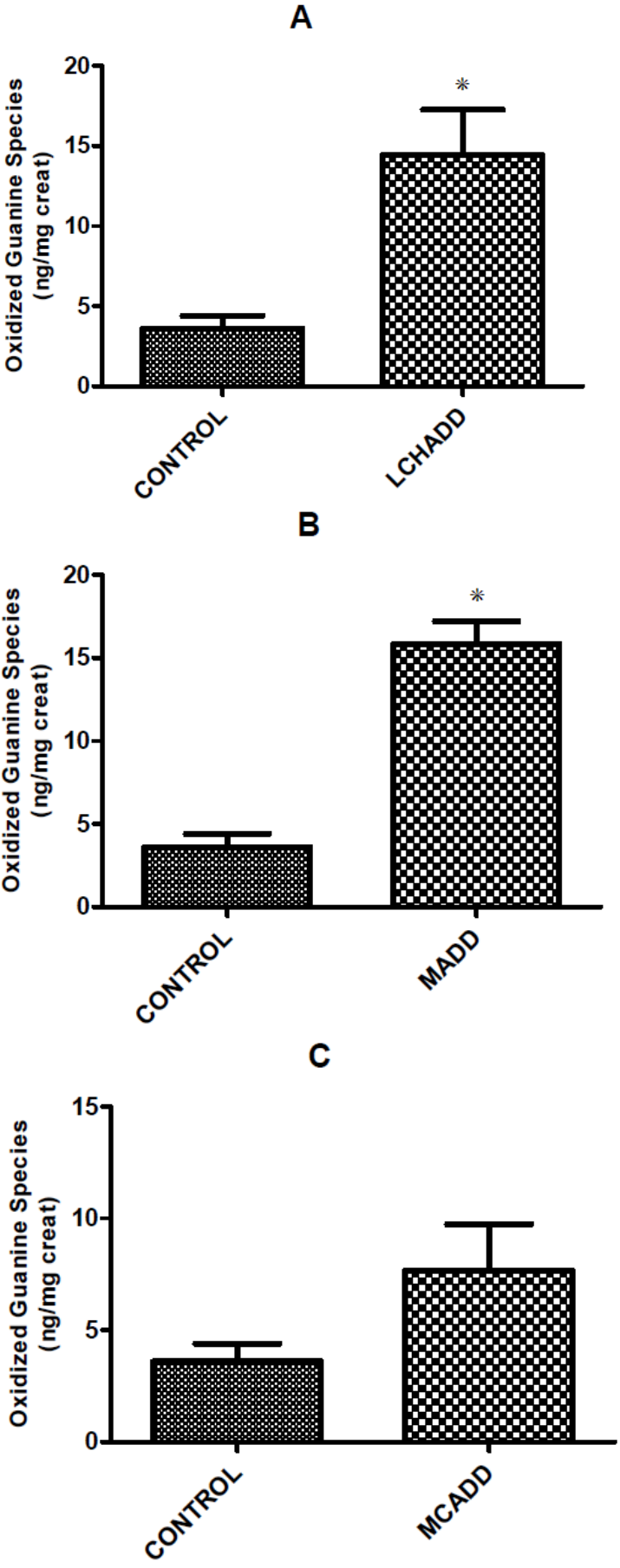
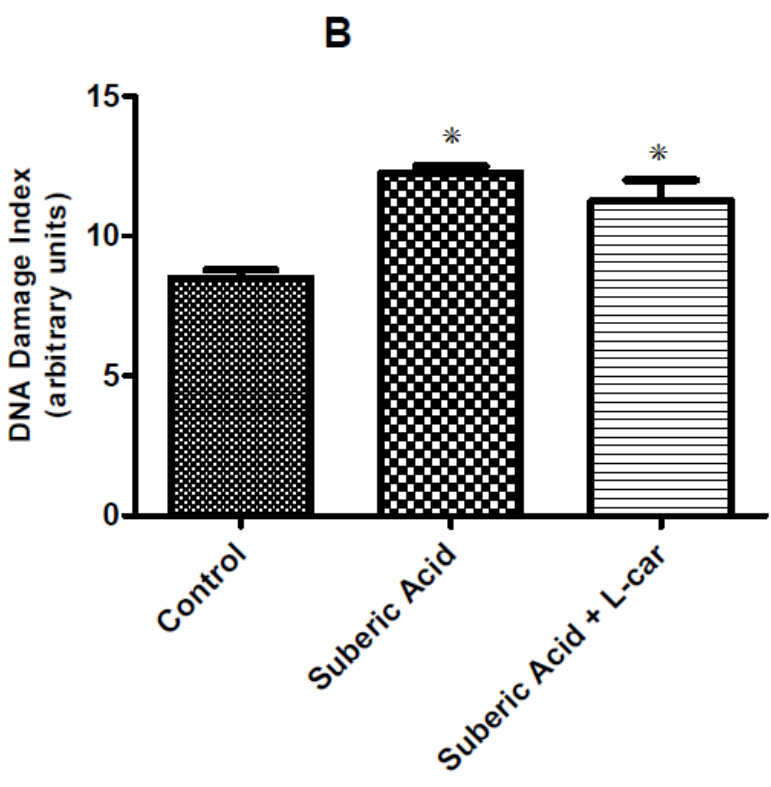
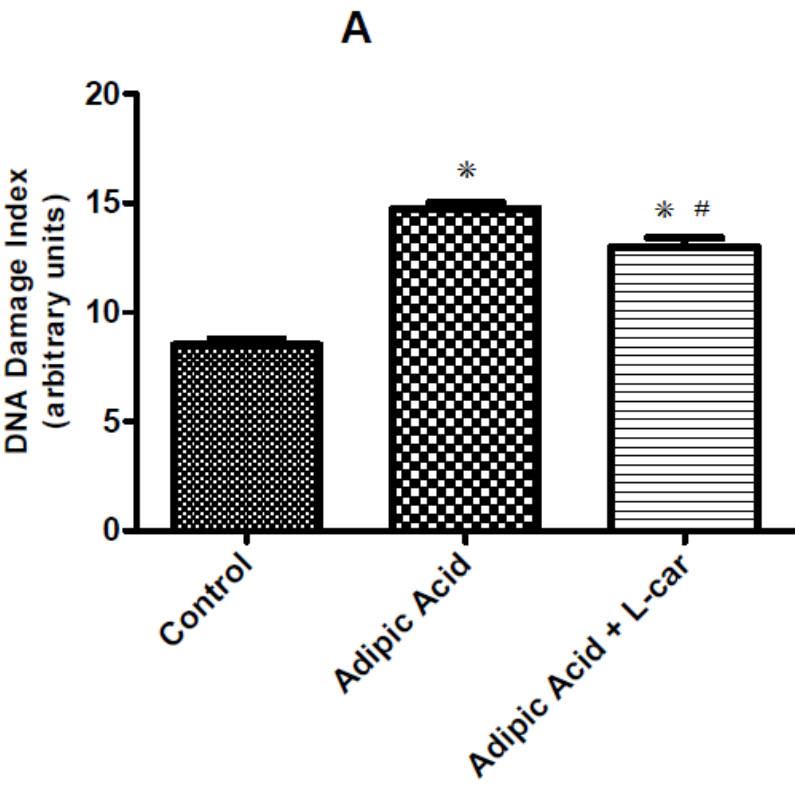


Figure 4:



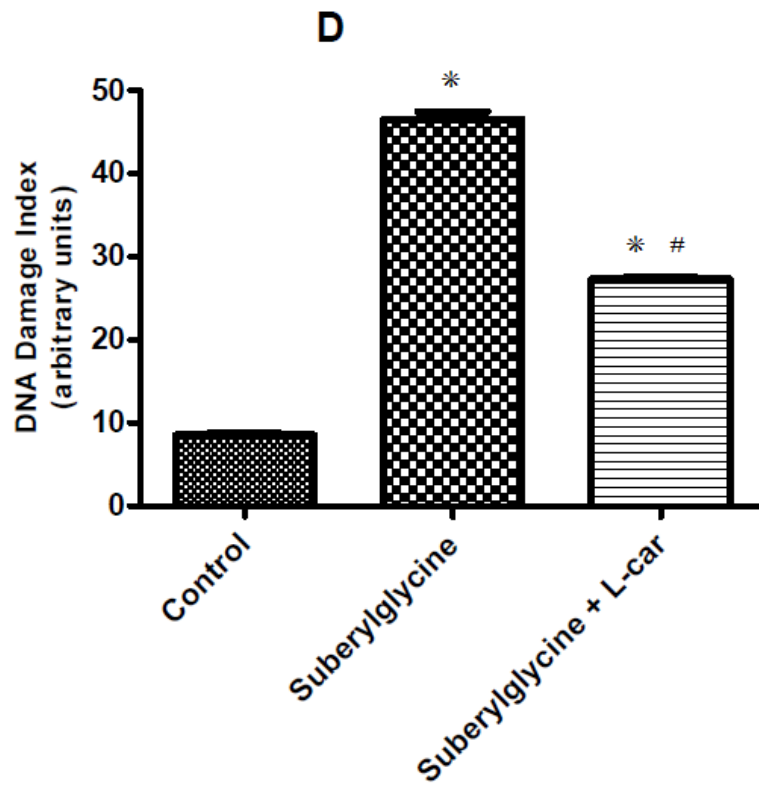
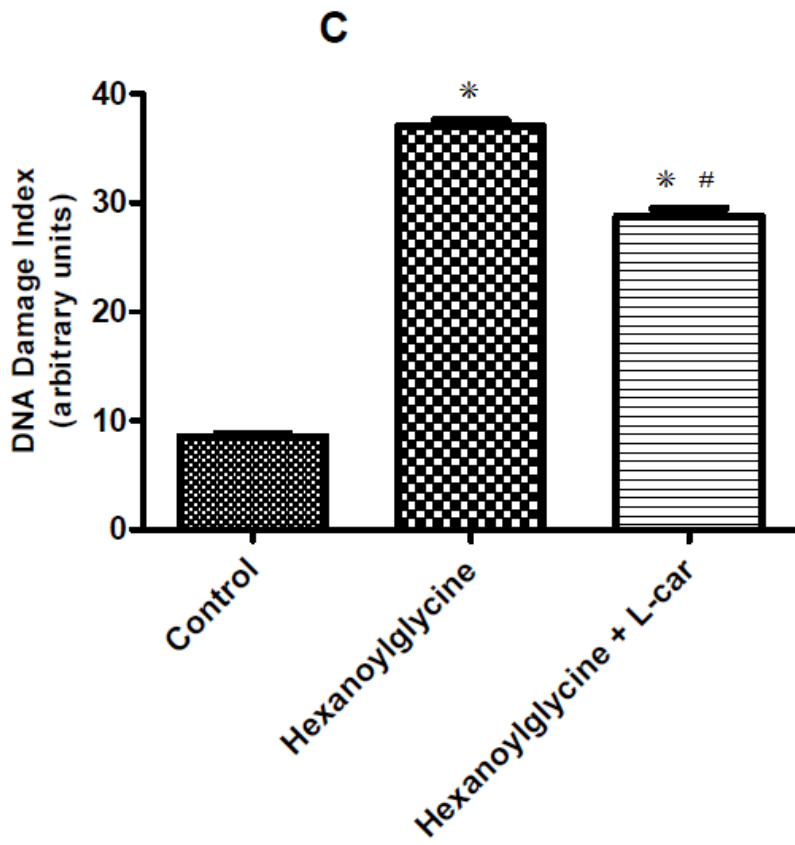


Figure 5:

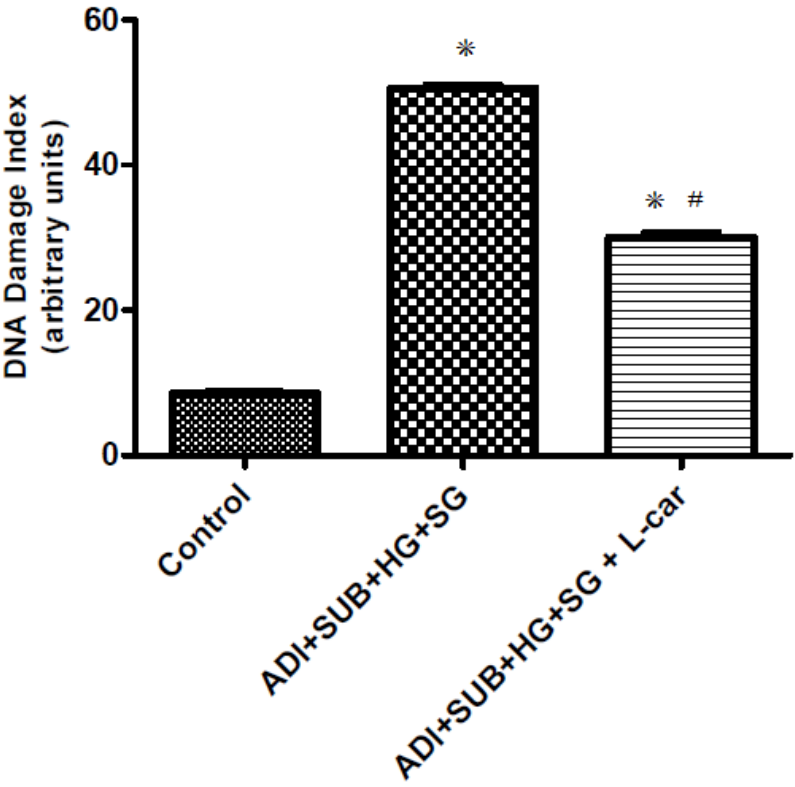


Table 1. DNA class damage induced *in vitro* by metabolites adipic acid (3mM), suberic acid (3mM), hexanoylglycine (0.5mM) and suberylglycine (1.5mM), isolated and in combination.

Metabolites	DI (mean \pm SEM) n=4	Σ Damage class				
		0	1	2	3	4
Control	8.5 \pm 0.57	91	8	0	0	0
Adipic Acid (ADI)	15 \pm 0.5	82	15	0	0	0
Suberic Acid (SUB)	12 \pm 0.5	88	12	0	0	0
Hexanoylglycine (HG)	37 \pm 1.15	70	24	5	1	0
Suberylglycine (SG)	46 \pm 1.91	66	23	10	1	0
ADI + SUB + HG + SG	51 \pm 1.0	62	26	9	2	0

4. DISCUSSÃO

Os defeitos na beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos são doenças hereditárias autossômicas recessivas, resultantes de uma deficiência enzimática que compromete o catabolismo dos ácidos graxos, fonte de energia essencial durante o jejum e crises metabólicas. As características clínicas dos pacientes portadores dessas deficiências são relativamente similares e incluem hipoglicemia hipocetótica, hipotonia e acidose metabólica (Scriver et al., 2001). A elevação nas concentrações dos metabólitos pode levar, no caso de pacientes portadores da LCHADD, à doença hepática, cardiomiopatia hipertrófica, miopatia esquelética, e mesmo neuropatia periférica e retinopatia pigmentar. A mortalidade nos primeiros anos de vida ocorre majoritariamente devido à descompensação cardíaca e à insuficiência hepática, em casos mais severos (Roe e Ding, 2001; Tyni et al., 1997). Os pacientes portadores de MCADD apresentam um prognóstico favorável se é realizado um diagnóstico precoce, podendo ocorrer episódios de vômitos e letargia em situações de jejum ou infecções virais, além de hipoglicemia hipocetótica, acidose metabólica e hipotonia. É possível haver convulsões, fraqueza muscular, hepatopatia com hiperamonemia, além de encefalopatia progressiva em pacientes não tratados devido à baixa disponibilidade de substratos cerebrais, como glicose e corpos cetônicos, à hiperamonemia, e ao acúmulo de metabólitos tóxicos, levando à ruptura das funções energéticas cerebrais (Touma e Charpentier, 1992; Roe e Ding, 2001). Na MADD além de hipoglicemia hipocetótica, acidose metabólica e hipotonia, se observa, no tipo neonatal severo, hepatomegalia, displasia renal, dismorfia, podendo ser fatal nos primeiros dias de vida, enquanto nos pacientes portadores do tipo tardio moderado, se observam episódios de vômitos intermitentes e miopatia, além da

síndrome de Reye (Roe e Ding, 2001; Frerman et al., 1985). O tratamento dos defeitos de beta oxidação mitocondrial de ácidos graxos se baseia em uma dieta rica em carboidratos de absorção rápida e pobre em proteínas e gorduras, uma vez que eles não têm a atividade normal da enzima responsável pelo seu metabolismo. Além disso, em casos onde há deficiência secundária de carnitina, cuja fonte é principalmente proveniente da dieta e uma pequena parcela é sintetizada endogenamente, é feita uma suplementação desse composto geralmente na dose de 50-100mg/kg/dia (Scriver et al., 2001; Evangeliou e Vlassopoulos, 2003). A L-carnitina é conhecida pelo seu papel no metabolismo energético, transportando ácidos graxos de cadeia longa para o interior na mitocôndria, onde serão oxidados a acetil-CoA para ser utilizado no ciclo Krebs (Bahl e Bressler, 1989; Gulcin, 2006). Por outro lado, recentes estudos têm demonstrado uma ação antioxidante e anti-inflamatória da L-carnitina em diversas patologias, como no modelo quimicamente induzido da doença da urina do xarope do bordo, em que a L-carnitina preveniu a lipoperoxidação, o dano a proteínas e alterações na atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase em ratos (Mescka et al., 2011). Além disso, a suplementação de L-car na dose de 50mg/kg/dia em pacientes portadores da doença da urina do xarope do bordo sob tratamento com dieta hipoproteica reduziu a lipoperoxidação plasmática e o índice de dano ao DNA (Mescka et al., 2015).

Embora diversos estudos tenham demonstrado o envolvimento dos metabólitos tóxicos acumulados na fisiopatologia destas doenças, os mecanismos patogênicos ainda não são completamente conhecidos. O estresse oxidativo parece estar relacionado aos mecanismos patogênicos em alguns erros inatos do metabolismo caracterizados pelo acúmulo de metabólitos tóxicos como a acidemia glutárica tipo I e a fenilcetonúria, além de um perfil inflamatório (Guerreiro et al.,

2018; Deon et al. 2015). Os radicais livres são átomos ou moléculas com alta reatividade e que, em elevadas concentrações, são capazes de causar danos às biomoléculas perturbando o equilíbrio redox celular (Halliwell e Gutteridge, 2007). Recentes trabalhos evidenciaram os efeitos *in vitro* de metabólitos acumulados na MCADD, como os ácidos octanóico e decanóico, e de metabólitos acumulados na LCHADD, como os ácidos 3-hidroxiodecanóico, 3-hidroxitetradecanóico e 3-hidroxi palmítico (Tonin et al., 2010; Schuck et al., 2009). Outros pesquisadores demonstraram um aumento modesto na concentração das citocinas interferon-gama, interleucina-8 e quimiocina derivada de macrófagos em plasma de pacientes portadores da LCHADD em tratamento, além de uma diminuição da interleucina-10, evidenciando uma inflamação moderada nesses pacientes (McCoin et al., 2019).

Este trabalho investigou parâmetros de estresse oxidativos e nitrosativo em amostras de pacientes portadores das deficiências de MCAD, LCHAD e MAD e identificou aumento significativo dos níveis de 8-isoprostanos na urina de todos os grupos de pacientes no momento do diagnóstico em comparação ao grupo controle. Os isoprostanos são uma família de eicosanóides de origem não-enzimática produzidos pela oxidação de fosfolípídeos dos tecidos por radicais livres de oxigênio e, portanto, sua detecção indica lipoperoxidação na amostra analisada (Esterbauer et al., 1991). Os achados deste trabalho demonstram que os pacientes portadores de defeitos na beta-oxidação de ácidos graxos nas deficiências de MCAD, LCHAD e MAD estão expostos ao dano oxidativo a lipídeos, que pode levar ao comprometimento da fluidez e da permeabilidade das membranas celulares (Morrow et al., 1990). Outros pesquisadores (Derks et al., 2014) verificaram elevação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, que reflete a formação de malondialdeído, um produto final da lipoperoxidação de ácidos graxos de membrana, em amostras

de plasma de pacientes com deficiência da MCAD, corroborando com os resultados obtidos neste estudo. Em outros erros inatos do metabolismo também foi identificado aumento do dano a lipídeos associado ao acúmulo de metabólitos tóxicos, como no caso da acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica, caracterizada pelo excesso dos ácidos 3-metilglutárico e 3-hidroxi-3-metilglutárico (Dos Santos Mello et al., 2018) e na fenilcetonúria, caracterizada pelo excesso de fenilalanina (Deon et al., 2015), indicando um envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo fisiopatológico destas doenças. Em estudos *in vitro* em cérebro de ratos sobre o efeito dos metabólitos acumulados na MCADD, foi demonstrado que os ácidos octanóico e decanóico (nas concentrações de 0,5, 1 e 3 mM) aumentaram os níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (Schuck et al., 2009), bem como a hexanoilglicina, a decanoilglicina e a decenoilglicina (nas concentrações de 0,5 e 1 mM) (Tonin et al., 2012) e que os efeitos *in vitro* dos metabólitos da LCHADD ácidos 3-hidroxidodecanóico, 3-hidroxitetradecanóico e 3-hidroxdipalmítico (nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 μ M) também aumentaram os níveis dessas espécies (Tonin et al., 2010). Estes achados reforçam que o mecanismo fisiopatológico dos metabólitos tóxicos acumulados nos defeitos de beta-oxidação de ácidos graxos é pela via oxidativa, causando dano a lipídeos, como verificado também pelos nossos resultados em urina de pacientes no momento do diagnóstico.

O estresse nitrosativo também contribui para os danos às biomoléculas celulares. O óxido nítrico, composto produzido em diversos tipos de células pela enzima óxido nítrico sintase, desempenha várias funções fisiológicas como a regulação do tônus vascular, neurotransmissão e modulação de processos inflamatórios contra microorganismos invasores. Em altas concentrações, este composto acumulado pode reagir com o oxigênio molecular resultando na formação

de nitrito, que é rapidamente oxidado a nitrato, e também pode reagir com o radical superóxido formando peroxinitrito, que é uma espécie altamente oxidante (Anggard, 1994). O nitrato pode ser convertido a nitrito, pela ação da enzima nitrato redutase, sendo a medida de seus níveis um importante biomarcador de situações onde haja estresse nitrosativo, ou seja, detectam aumento na produção de óxido nítrico (Nims et al., 1995). O presente estudo avaliou as espécies reativas de nitrogênio pela medida dos níveis de nitritos e nitratos em amostras de urina de pacientes portadores das deficiências de MCAD, LCHAD e MAD no diagnóstico e verificou que somente o grupo de pacientes com LCHADD apresentou aumento significativo deste biomarcador, comparado ao grupo controle, indicando aumento na produção de óxido nítrico, potencialmente tóxico às biomoléculas. Entretanto, foi possível observar uma tendência de aumento dos níveis destes compostos em pacientes portadores de MCADD e de MADD, que talvez pudesse se mostrar significativo por um estudo com um maior número de pacientes. Outros trabalhos investigaram o dano pelas espécies reativas de nitrogênio em erros inatos do metabolismo e verificaram aumento nos níveis de nitritos e nitratos em pacientes com mucopolissacaridose do tipo II, caracterizada pelo acúmulo de glicosaminoglicanos (Jacques et al., 2016) evidenciando a relação de metabólitos tóxicos com a elevada produção de óxido nítrico. Assim, podemos sugerir que os metabólitos da LCHADD também atuam pela via nitrosativa levando ao estresse nitrosativo. Tonin et al. (2010) investigaram o efeito *in vitro* em cérebro de ratos dos ácidos 3-hidroxdodecanóico, 3-hidroxitetradecanóico e 3-hidroxipalmítico (nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 μM) e demonstraram que estes compostos não afetaram os níveis de nitritos e nitratos, indicando um não envolvimento das espécies reativas de nitrogênio nestas concentrações, diferentemente dos nossos resultados obtidos em

urina de pacientes portadores de LCHADD, os quais refletem o efeito sinérgico dos vários metabólitos acumulados nesta doença. Alguns trabalhos que testaram o efeito *in vitro* de metabólitos tóxicos acumulados em outros erros inatos do metabolismo observaram níveis de nitritos e nitratos exacerbados, como no caso do modelo animal crônico quimicamente induzido de tirosinemia do tipo II, modelo este induzido pela administração crônica de L-tirosina em ratos na concentração de 500 mg/kg duas vezes ao dia durante 21 dias (Streck et al., 2017) bem como no modelo animal experimental de galactosemia, induzido pela administração aguda única de galactose na concentração de 5 $\mu\text{mol/g}$ e avaliação realizada 1, 12 e 24 horas após a injeção (Castro et al., 2016). Estes resultados indicam que os metabólitos acumulados na tirosinemia e na galactosemia estão relacionados ao aumento da produção de óxido nítrico, assim como no nosso estudo. Os altos níveis de óxido nítrico podem causar destruição dos grupos ferro-enxofre, nitrosação de grupos tiol, além de nitração de resíduos de tirosina, acarretando danos de diferentes magnitudes aos sistemas biológicos (Pryor et al., 1994).

O dano ao DNA causado pelos radicais livres ocorre por meio de interações com metais de transição gerando diversos tipos de lesões que podem incluir quebras de cadeias de DNA, sítios abásicos, espécies de purinas e de pirimidinas oxidadas e ligações cruzadas entre DNA e proteína (Halliwell e Gutteridge, 2007; Wajner et al., 2004). O DNA mitocondrial é considerado mais sensível ao ataque das espécies reativas em relação ao DNA nuclear, devido à sua maior proximidade do local de formação das EROs na cadeia transportadora de elétrons e por não possuir proteínas histonas protetoras (Halliwell e Gutteridge, 2007). O presente estudo analisou o conteúdo de espécies oxidadas de guanina, que identifica tanto dano ao DNA quanto ao RNA, pela dosagem de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (oxidação do

DNA), 8-hidroxi-guanosina (oxidação do RNA) e 8-hidroxi-guanina (oxidação do DNA e do RNA), em amostras de urina de pacientes portadores das deficiências de MCAD, LCHAD e MAD. Foi verificado um aumento significativo dessas espécies nos grupos de pacientes com LCHAD e MAD, mas não em pacientes com MCAD, em comparação ao grupo controle, embora se possa observar uma tendência de aumento deste biomarcador neste grupo de pacientes. Outros estudos também demonstraram elevação dos níveis de espécies de guanina oxidada em urina de pacientes portadores da acidúria L-2-hidroxi-glutárica, na qual se acumula o ácido L-2-hidroxi-glutárico, além do efeito *in vitro* deste metabólito na concentração de 30µM sobre o dano ao DNA em leucócitos periféricos (Rodrigues et al., 2017), indicando o envolvimento dos metabólitos tóxicos acumulados neste tipo de lesão. O DNA oxidado é continuamente reparado por enzimas e as espécies de guanina oxidadas são liberadas e excretadas na urina, cuja detecção é indicativa de dano oxidativo (Cooke et al., 2003). Quando há uma intensa elevação deste tipo de dano e não há um aumento concomitante dos mecanismos de reparação, as células podem sofrer mutações, alterações na expressão gênica, com comprometimento das funções celulares, podendo ocorrer até mesmo o processo de morte celular. Dessa forma, os nossos resultados sugerem que o acúmulo de metabólitos nas deficiências da LCHAD e da MAD possa estar relacionado com o aumento na oxidação de guanina, que reflete o dano ao DNA nos pacientes portadores destas doenças.

Atualmente faltam dados na literatura referentes ao efeito dos metabólitos acumulados nos defeitos de beta-oxidação de ácidos graxos sobre o dano ao DNA. Assim, o presente estudo investigou o efeito *in vitro* sobre o dano ao DNA em leucócitos humanos periféricos induzido por ácido adípico, ácido subérico, hexanoilglicina e suberilglicina, isolada e conjuntamente, nas concentrações de

3mM, 3mM, 0,5mM e 1,5 mM, respectivamente, pelo ensaio cometa. Estes metabólitos estão elevados principalmente na urina de pacientes portadores da MCADD, embora frequentemente seja possível detectar os ácidos adípico e subérico também na urina de pacientes portadores da LCHADD e da MADD. Além disso, objetivamos avaliar a influência da L-carnitina (60 μ M) sobre o dano ao DNA provocado pelos metabólitos.

O ensaio cometa é muito utilizado devido à sua realização simples, rápida, de baixo custo e sensível para a detecção de baixos níveis de dano ao DNA em células individuais sob condições alcalinas (pH>13), onde ocorre a desnaturação do DNA e possibilita avaliar as quebras de fita simples e dupla e sítios álcali-lábeis (Singh et al., 1988; Collins, 2014). No ensaio *in vitro*, leucócitos periféricos humanos são isolados após a incubação com os metabólitos, misturados à agarose e espalhados sobre uma lâmina de vidro pré-revestida com agarose e submetidos à eletroforese. Devido a corrente elétrica aplicada, ocorre migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebra, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as lâminas são coradas com nitrato de prata e posteriormente analisadas em microscópio óptico, onde é feita a contagem de 100 células, e cada célula é classificada por um escore que varia de 0 - sem migração - até 4 - migração máxima - de acordo com a intensidade da cauda, resultando em um índice de dano entre 0 e 400 (Tice et al., 2000).

No presente trabalho, foi observado um aumento significativo do dano ao DNA induzido pelos ácidos adípico (3mM) e subérico (3mM), comparados ao controle, apresentando um índice de dano de 15 e 12 unidades arbitrárias, respectivamente, em leucócitos humanos. A co-incubação com L-carnitina (60 μ M) foi capaz de diminuir significativamente o dano induzido apenas pelo ácido adípico. Os

metabólitos hexanoilglicina (0,5mM) e suberilglicina (1,5mM) também aumentaram significativamente o dano em relação ao controle, apresentando um índice de dano mais alto que os ácidos, sendo 37 e 46 unidades arbitrárias, respectivamente. Este resultado indica uma maior genotoxicidade da hexanoilglicina e da suberilglicina evidenciado inclusive pela classe de dano 2 provocada por eles, enquanto os ácidos adípico e subérico provocaram apenas classe de dano 1 nas células avaliadas, mesmo em concentrações mais baixas que os ácidos. A co-incubação com L-carnitina (60µM) diminuiu significativamente o dano ocasionado por ambos os metabólitos, hexanoilglicina e suberilglicina, sugerindo uma ação protetora da molécula.

Com o propósito de verificar se ocorreria um efeito sinérgico dos metabólitos, avaliamos a sua incubação conjunta e observamos o maior índice de dano (51 unidades arbitrárias) e, ao mesmo tempo, a maior classe de dano (classe 3), evidenciando uma lesão potencializada. Nestas condições a L-carnitina (60µM) também diminuiu significativamente o índice de dano, embora não aos níveis do controle, demonstrando sua capacidade de atenuar o DNA das lesões induzidas pelos metabólitos tóxicos. Em um estudo *in vitro* com leucócitos de pacientes portadores da doença da urina do xarope do bordo em tratamento com dieta de restrição proteica, onde se acumulam aminoácidos de cadeia ramificada, foi observado um índice de dano ao DNA significativamente elevado em comparação aos leucócitos de indivíduos controle (Mescka et al., 2015). Guerreiro et al. (2018) avaliou o efeito do ácido glutárico nas concentrações de 0,5, 3 e 6 mM em leucócitos humanos periféricos e verificou que este metabólito induziu um aumento significativo no índice de dano ao DNA comparado ao controle. Fenilalanina, o principal metabólito neurotóxico da fenilcetonúria, nas concentrações de 1000 e 2500 µM,

também induziu uma elevação significativa no índice de dano ao DNA em leucócitos comparado aos controles (Deon et al., 2015). Pacientes portadores da adrenoleucodistrofia ligada ao X, doença caracterizada pelo acúmulo dos ácidos graxos de cadeia muito longa, ácidos tetracosanóico e hexacosanóico, apresentaram aumento significativo do dano ao DNA (Marchetti et al., 2015).

Os achados do nosso trabalho reforçam a hipótese de que os metabólitos tóxicos acumulados nos defeitos de beta-oxidação dos ácidos graxos, em especial na MCADD, são responsáveis, ainda que parcialmente, por causar lesões ao DNA, sendo que uma maior intensidade de lesão foi observada na incubação concomitante, situação que ocorre no sangue dos pacientes. Além disso, no teste de co-incubação, verificamos que a L-carnitina diminuiu o DNA do dano induzido por praticamente todos os metabólitos. De fato, em países como a França, onde é realizada a triagem neonatal, já existe um consenso sobre a prescrição de L-carnitina para pacientes com a deficiência secundária (Feillet et al., 2012). Cabe salientar que a L-carnitina demonstrou efeito protetor antioxidante *in vivo* em pacientes portadores da doença da urina do xarope do bordo, bem como em pacientes fenilcetonúricos, além de prevenir a indução do dano ao DNA induzido pelo ácido glutárico, o qual está em altas concentrações em pacientes portadores de acidemia glutárica tipo I (Mescka et al., 2015; Guerreiro et al., 2018; Deon et al., 2015). Nossos resultados corroboram com as evidências destes trabalhos, ressaltando o papel protetor da L-carnitina frente ao potencial lesivo de metabólitos tóxicos acumulados em vários erros inatos do metabolismo, sendo interessante considerar a suplementação com esta molécula como uma terapia adjuvante em pacientes com acúmulo destes metabólitos, e deficiência secundária de carnitina.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos por esta dissertação, foi possível concluir que:

1. Os pacientes portadores das deficiências de MCAD, LCHAD e MAD apresentam dano a lipídeos;
2. Os pacientes portadores da deficiência de LCHAD apresentam estresse nitrosativo;
3. Os pacientes portadores das deficiências de LCHAD e de MAD apresentam dano oxidativo ao DNA;
4. Os metabólitos ácidos adípico (3mM), subérico (3mM), a hehanoilglicina (0,5mM) e a suberilglicina (1,5mM) induzem dano *in vitro* ao DNA em leucócitos humanos periféricos;
5. A ação sinérgica destes metabólitos potencializa o dano ao DNA induzido *in vitro* em leucócitos humanos periféricos;
6. A L-carnitina (60 μ M) é capaz de diminuir *in vitro* as lesões ao DNA em leucócitos humanos periféricos, causadas por ácido adípico, hexanoilglicina e suberilglicina, inclusive as causadas pela combinação dos metabólitos.

Em conclusão, nossos achados demonstraram que os ácidos adípico, subérico, a hehanoilglicina e a suberilglicina provocam dano *in vitro* ao DNA, bem como levam à potencialização do dano provocado pela ação sinérgica entre eles. Além disso, o presente trabalho verificou que a L-carnitina tem a capacidade de atenuar a lesão ao DNA *in vitro* induzida por estes metabólitos, elucidando um papel protetor deste composto. Ainda, se verificou que os pacientes portadores da

deficiência de LCHAD apresentaram dano a lipídeos, estresse nitrosativo e dano oxidativo ao DNA; já os pacientes portadores da deficiência de MAD apresentaram dano a lipídeos e estresse nitrosativo; enquanto os pacientes portadores da deficiência de MCAD apresentaram dano a lipídeos.

6. PERSPECTIVAS

Algumas perspectivas deste trabalho para o melhor entendimento das doenças estudadas são:

- Avaliar o perfil inflamatório em amostras de pacientes portadores das deficiências de LCHAD, MCAD e MAD;
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, bem como o conteúdo de GSH em amostras de pacientes portadores das deficiências de LCHAD, MCAD e MAD;
- Analisar o efeito *in vitro* de outros antioxidantes, como a N-acetilcisteína, sobre o dano ao DNA induzido por ácidos adípico, subérico, hexanoilglicina e suberilglicina;
- Realizar o estudo molecular em pacientes com defeitos de beta-oxidação de ácidos graxos, identificar a mutação genética associada nesses pacientes e correlacionar com o fenótipo e com os metabólitos acumulados;
- Analisar os principais metabólitos acumulados em pacientes portadores das deficiências de MCAD, LCHAD e MAD tratados com L-carnitina e correlacionar com os parâmetros de estresse oxidativo.

7. REFERÊNCIAS

Anggard E. Nitric oxide: mediator, murdered, and medicine. *Lancet*. (1994) 343: 1199–1206.

Bahl J, Bressler J. The pharmacology of carnitine. *Pharmacology*. (1989) 337: 118-284.

Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*. (1999) 65:1865-74.

Bremer J. Carnitine metabolism and functions. *Physiological Reviews*. (1983) v.63, p.1420–1480.

Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina, B. Aires*. (1998) 58:350-356.

Castro MB, Ferreira BK, Cararo JH, Chipindo AE, Magenis ML, Michels M, Danielski LG, Oliveira MR, Ferreira GC, Streck EL, Petronilho F, Schuck PF. Evidence of oxidative stress in brain and liver of young rats submitted to experimental galactosemia. *Metab Brain Dis*. (2016) 31:1381–1390.

Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica Biophysica Acta*. (2014) v. 1840, n. 2. p. 794-800.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB J*. (2003) 17: 1195-1214

Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta*. (2006) 365:30-49.

Cornelius N, Frerman FE, Corydon TJ, Palmfeldt J, Bross P, Gregersen N, Olsen RKJ. Molecular mechanisms of riboflavin responsiveness in patients with ETF-QO variations and multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Hum. Mol. Genet*. (2012) 21, 3435–3448.

Cornelius N, Byron C, Hargreaves I, Guerra PF, Furdek AK, Land J, Radford WW, Frerman F, Corydon TJ, Gregersen N, Olsen RK. Secondary coenzyme Q10 deficiency and oxidative stress in cultured fibroblasts from patients with riboflavin responsive multiple Acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Hum. Mol. Genet*. (2013) 22:3819–3827.

Cornelius N, Corydon TJ, Gregersen N, Olsen RKJ. Cellular consequences of oxidative stress in riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency patient fibroblasts. *Human Molecular Genetics*. (2014) 23(16): 4285–4301.

Costa CG, Guérand WS, Struys EA, Holwerda U, ten Brink HJ, Tavares de Almeida I, Duran M, Jakobs C. Quantitative analysis of urinary acylglycines for the diagnosis of beta-oxidation defects using GC-NCI-MS. *J Pharm Biomed Anal*. (2000) 21:1215-24 .

Delanty N, Dichter MA. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand Sep*. (1998) 98:145-53.

den Boer ME, Wanders RJ, Morris AA, IJlst L, Heymans HS, Wijburg FA. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients. *Pediatrics*. (2002) 109(1), 99-104.

Deon M, Sitta A, Faverzani JL, Guerreiro GB, Donida B, Marchetti DP, et al. Urinary biomarkers of oxidative stress and plasmatic inflammatory profile in phenylketonuric treated patients. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev Neurosci*. (2015) 47: 259–265.

Derks TG, Touw CM, Ribas GS, Biancini GB, Vanzin CS, Negretto G, Mescka CP, Reijngoud DJ, Smit GP, Wajner M, Vargas CR. Experimental evidence for protein oxidative damage and altered antioxidant defense in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* (2014) 37: 783–789

Dos Santos Mello M, Ribas GS, Wayhs CA, et al. Increased oxidative stress in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Mol Cell Biochem*. (2015) 402(1–2): 149–155.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med*. (1991) 11: 81-128.

Evangelidou A, Vlassopoulos D. Carnitine metabolism and deficit — when supplementation is necessary? *Curr. Pharm. Biotechnol*. (2003) 4 (3): 211–219.

Feillet F, Ogier H, Cheillan D, et al. Medium-chain acyl-CoA-dehydrogenase (MCAD) deficiency: french consensus for neonatal screening, diagnosis, and management. *Arch Pediatr*. (2012) 19(2):184–193.

Frerman FE, Goodman SI. Deficiency of electron transfer flavoprotein or electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase in glutaric acidemia type II fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1985) 82 (13): 4517–4520.

Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* (1998) 273 (18): 11038-11043.

Grosse SD, Khoury MJ, Greene CL, Crider KS, Pollitt RJ. The epidemiology of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: An update. *Genet Med.* (2006) 8:205- 212.

Guerreiro G, Faverzani J, Jacques CED, Marchetti DP, Sitta A, Coelho DM, Kayser A, Kok F, Athayde L, Manfredini V, Wajner M, Vargas, CR. Oxidative damage in glutaric aciduria type I patients and the protective effects of L-carnitine treatment. *J. Cell. Biochem.* (2018) 119: 10021–10032.

Gulcin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* (2006) 78: 803-811.

Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet.* (1994) 344:721-724.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* (2004) 142:231-55.

Halliwell B, Gutteridge JMC. (Eds). *Free radicals in biology and Medicine.* Oxford University Press, Oxford, 4. ed., (2007).

Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *American journal of kidney diseases.* (2003) v.41, p.S4-12.

Jacques CE, Donida B, Mescka CP, Rodrigues DG, Marchetti DP, Bitencourt FH, Burin MG, de Souza CF, Giugliani R, Vargas CR. Oxidative and nitrative stress and pro-inflammatory cytokines in Mucopolysaccharidosis type II patients: effect of long-term enzyme replacement therapy and relation with glycosaminoglycan accumulation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. basis Dis.,* (2016) 1862: 1608-1616.

Lindner M, Hoffmann GF, Matern D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *J Inherit Metab Dis.* (2010) 33(5): 521–6.

Marchetti DP, Donida B, da Rosa HT, Manini PR, Moura DJ, Saffi J, et al. Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *Int J Dev Neurosci.* (2015) 43:8–15.

Matsubara Y, Narisawa K, Tada K. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: molecular aspects. *Eur J Pediatr.* (1992) 151:154-9.

McCain CS, Gillingham MB, Knotts TA, Vockley J, Ono-Moore KD, Blackburn ML, Norman JE, Adams SH. Blood cytokine patterns suggest a modest inflammation phenotype in subjects with long-chain fatty acid oxidation disorders. *Physiol Rep.* (2019) 7(6): e14037.

Mescka C, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, Dalazen G, Coelho J, Cortes M, Terra M, Regla Vargas C, Dutra-Filho CS. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* (2011) 26:21–28.

Mescka CP, Guerreiro G, Hammerschmidt T, Faverzani J, Coelho DM, Manfredini V, Wayhs CAY, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas, CR. L-Carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients. *Mutat Res.* (2015) 775: 43–47.

Moraes MCS, Neto JBC, Menck CFM. DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. *Front Biosci.* (2012) 17:1362-1388.

Morrow JD, Harris TM, Roberts, LJ. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal. Biochem.* (1990) 184: 1-10.

Muthuswamy AD, Vedagiri K, Ganesan M, Chinnakannu P. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid. *Clinica Chimica Acta.* (2006) v.368, p.84-92.

Nims RW, Darbyshire JF, Saavedra JE, Christodoulou D, Hanbauer I, Cox GW, et al. Colorimetric Methods for the Determination of Nitric Oxide Concentration in Neutral Aqueous Solutions. *Methods.* (1995) 7: 48–54.

Onkenhout W, Venizelos V, van der Poel PFH, Van der Heuvel MPM, Poorthuis BJHM. Identification and quantification of intermediates of unsaturated fatty acid metabolism in plasma of patients with fatty acid oxidation disorders. *Clin Chem.* (1995) 41:1467–74.

Pennisi EM, Garibaldi M, Antonini G. Lipid Myopathies. *J. Clin. Med.* (2018) 7 (12)

Pradelles P, Grassi J, Maclouf J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem.* (1985) 57(7):1170–1173.

Pryor WA, Jin X, Squadrito GL. One-and-two-electron oxidations of methionine by peroxyntirite. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1994) 91:11173-11177.

Reznick AZ, Kagan VE, Ramsey R, Tsuchiya M, Khwaja S, Serbinova EA, Packer L. Antiradical effects in L-propionyl carnitine protection of the heart against ischemia-reperfusion injury: the possible role of iron chelation. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* (1992) v.296, p.394-401.

Ribas GS, Vargas CR, Wajner M. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene.* (2014) 533, 469–476.

Rocchiccioli F, Wanders RJ, Aubourg P, Vianey-Liaud C, Ijlst L, Fabre M, Cartier N, Bougneres PF. Deficiency of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: a cause of lethal myopathy and cardiomyopathy in early childhood. *Pediatr. Res.* (1990) 28, 657–662

Rodrigues DGB, de Moura Coelho D, Sitta Â, Jacques CED, Hauschild T, Manfredini V, Bakkali A, Struys EA, Jakobs C, Wajner M, Vargas CR. Experimental evidence of oxidative stress in patients with l-2-hydroxyglutaric aciduria and that l-carnitine attenuates in vitro DNA damage caused by d-2-hydroxyglutaric and l-2-hydroxyglutaric acids. *Toxicol in Vitro.* (2017) 42:47–53.

Roe CR, Ding J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 1909–1963*, New York: McGraw-Hill, New York (2001).

Saudubray JM, Charpentier C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8a edição. New York: Mc Graw-Hill (2001).

Schafer FQ, Buettner GR . Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* (2001) 30(11):1191-1212.

Schuck PF, Ferreira GC, Moura AP, Busanello ENB, Tonin AM, Dutra-Filho CS, Wajner M. Medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency elicit lipid and protein oxidative damage and decrease non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain. *Neurochem. Int.* (2009) 54: 519–525.

Schuck PF, Ferreira GC, Tonin AM, Viegas CM, Busanello ENB, Moura AP, Zanatta A, Klamt F, Wajner M. Evidence that the major metabolites accumulating in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency disturb mitochondrial energy homeostasis in rat brain. *Brain Res.* (2009) 1296: 117–126.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8a ed. New York: Mc Graw-Hill (2001).

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp Cell Res.* (1988) 175:184-191.

Smith CM, Marks AD, Lieberman MA. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, 2a ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins (2005).

Spiekerkoetter U, Lindner M, Santer R, Grotzke M, Baumgartner MR, Boehles H, Das A, Haase C, Hennermann JB, Karall D, de Klerk H, Knerr I, Koch HG, Plecko B, Röschinger W, Schwab KO, Scheible D, Wijburg FA, Zschocke J, Mayatepek E, Wendel U. Treatment recommendations in long-chain fatty acid oxidation defects: consensus from a workshop. *J. Inherit. Metab. Dis.* (2009) 32, 498–505

Streck EL, De Pra SDT, Ferro PR, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Agostini JF, Damiani A, Andrade VM, Schuck PF, Ferreira GC, Scaini G. Role of antioxidant treatment on DNA and lipid damage in the brain of rats subjected to a chemically induced chronic model of tyrosinemia type II. *Mol Cell Biochem.* (2017) 435:207–214.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* (2000) v. 35, n. 3, p. 206–221.

Tonin AM, Grings M, Busanello EN, Moura AP, Ferreira GC, Viegas CM, Fernandes CG, Schuck PF, Wajner M. Long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in LCHAD and MTP deficiencies induce oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int.* (2010) 56: 930–936.

Tonin AM, Ferreira GC, Grings M, Viegas CM, Busanello EN, Amaral AU, Zanatta A, Schuck PF, Wajner M. Disturbance of mitochondrial energy homeostasis caused by the metabolites accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain. *Life Sci.* (2010) 86: 825–831.

Touma EH, Charpentier C. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child.* (1992) 67(1): 142–5.

Tyni T, Palotie A, Viinikka L, Valanne L, Salo MK, von Döbeln U, Jackson S, Wanders R, Venizelos N, Pihko H. Long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency with the G1528C mutation: clinical presentation of thirteen patients. *J Pediatr.* (1997) 130(1):67-76.

Vasiljevski ER, Summers MA, Little DG, Schindeler A. Lipid storage myopathies: Current treatments and future directions. *Prog Lipid Res.* (2018) 72: 1-17.

Ventura FV, Ruiten J, Ijlst L, de Almeida IT, Wanders RJ. Differential inhibitory effect of long-chain acyl-CoA esters on succinate and glutamate transport into rat liver mitochondria and its possible implications for long-chain fatty acid oxidation defects. *Molecular Genetics and Metabolism.* (2005) 86(3): 344-352,.

Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insight from animal studies. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* (2004) v. 27, n. 4, p. 427-448.

Walter, J.H. L-carnitine in inborn errors of metabolism: what is the evidence? *Journal of Inherited Metabolic Disease.* (2003) v.26, p.181-188.

Wanders RJ, Vreken P, den Boer ME, Wijburg FA, van Gennip AH, IJlst L. Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis.* (1999) 22(4): 442-87.

Wulf D. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* (2001) 82:47-95.

8. ANEXOS

8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Comissão Científica

Projeto: 2018/0549

Título: Investigação dos biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes portadores de deficiências na beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos: efeito da L-carnitina

Pesquisador Responsável: CARMEN REGLA VARGAS

Equipe de Pesquisa:

MOACIR WAJNER

ALINE KAYSER

MAIRA SILMARA DE MORAES

DANIELLA DE MOURA COELHO

ANGELA SITTA

Data de Aprovação: 22/10/2018

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

8.2 Ficha de dados dos indivíduos

1. Data da coleta:

2. Nome completo:

3. Data de nascimento: ____/____/____ (DD/MM/AAAA)

4. Idade:

5. Sexo: () masc. () fem.

6. Motivo da solicitação do exame:

7. Apresenta doenças já diagnosticadas?

diabete melito () não () sim

hipotireoidismo () não () sim

hipertireoidismo () não () sim

hipertensão arterial sistêmica (HAS) () não () sim

acidente vascular cerebral (AVC) () não () sim

cardiopatia isquêmica () não () sim

insuficiência cardíaca () não () sim

insuficiência hepática () não () sim

insuficiência renal () não () sim

outras: _____

8. Está usando medicamento? () não () sim: _____

9. Doenças na família biológica:

dislipidemia () não () sim

hipertensão arterial sistêmica (HAS) () não () sim

cardiopatia isquêmica () não () sim

acidente vascular cerebral (AVC) () não () sim

diabete melito () não () sim

outra doença crônica: _____

10. Fuma? () não () sim

8.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: pacientes portadores de Defeitos na Beta-Oxidação de Ácidos Graxos

Estamos convidando você ou a pessoa pela qual você é responsável, que é portadora de Deficiência na Beta-Oxidação Mitocondrial de Ácidos Graxos, a participar do projeto de pesquisa intitulado “Investigação dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Pacientes Portadores de Deficiência na Beta-Oxidação Mitocondrial de Ácidos Graxos: Efeito da L-carnitina e da N-acetilcisteína”. O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, formados por radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com deficiência na Beta-Oxidação Mitocondrial de Ácidos Graxos.

Para participar da pesquisa, será necessário responder a perguntas sobre informações de saúde do participante e o histórico pessoal e familiar relacionado à doença. Se você autorizar, será coletada uma amostra de sangue e urina juntamente com exames realizados no seu atendimento usual no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), ou seja, não necessário realizar nova coleta de sangue e urina para participar da pesquisa. Estes dados serão coletados nos dias de consultas rotineiras, não sendo necessário o comparecimento em consultas extras. Caso necessário, dados adicionais serão obtidos dos prontuários dos pacientes. O tempo necessário para participação é em torno de 15 minutos. O material coletado assistencialmente será utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo garantida a confidencialidade das informações obtidas e que você (a pessoa pela qual você é responsável) terá acesso às mesmas. Os resultados obtidos serão agrupados e expressos através de resultados numéricos, sem qualquer referência a elementos

que possam identificar as pessoas que participaram do estudo. Após o término do estudo os materiais biológicos (sangue periférico e urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do grupo, de acordo com a sua decisão de autorizar ou não o uso futuro. Se autorizado, será enviado um novo projeto de pesquisa ao Comitê de Ética e você será chamado a reconseguir com o uso do material armazenado.

Os riscos e desconfortos associados à participação são relacionados ao tempo destinado a responder as perguntas.

Os benefícios associados à participação não são diretos a você, no entanto, as informações obtidas na pesquisa poderão ajudar pacientes com essa mesma condição no futuro

Cabe salientar que a participação no estudo é totalmente voluntária e você poderá se não autorizar a participação sem que haja qualquer interferência no seu atendimento, ou de qualquer familiar no HCPA. Você também poderá desistir a qualquer momento da participação. É importante ressaltar também, que você ou a pessoa pela qual você é responsável não receberão nenhum tipo pagamento pela participação no estudo e que todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa, portanto, serão completamente gratuitas para você.

A pesquisadora responsável pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas) e a pesquisadora assistente (mestranda Maira Silmara de Moraes) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no Serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51) 3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de

Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 3359.7640, de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas (assinada por nós) será entregue a você (participante ou responsável legal pelo participante da pesquisa) e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.

Data:_____

Nome do Participante_____

Assinatura do Participante (se aplicável):_____

Nome do responsável:_____

Assinatura do responsável _____

Nome do pesquisador:_____

Assinatura do pesquisador:_____

8.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: indivíduos controle

Estamos convidando você ou a pessoa pela qual você é responsável, que é portadora de Deficiência na Beta-Oxidação Mitocondrial de Ácidos Graxos, a participar do projeto de pesquisa intitulado “Investigação dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo em Pacientes Portadores de Deficiência na Beta-Oxidação Mitocondrial de Ácidos Graxos: Efeito da L-carnitina e da N-acetilcisteína”. O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos da ação dos radicais livres (por exemplo, formados por radiação solar) e de substâncias antioxidantes (por exemplo, vitaminas) em pacientes com deficiência na Beta-Oxidação Mitocondrial de Ácidos Graxos. Você está sendo convidado a participar porque não tem a doença e suas informações serão utilizadas para comparação com pacientes com esta condição.

Para participar da pesquisa, será necessário responder a perguntas sobre informações de saúde do participante e o histórico pessoal e familiar relacionado à doença. Se você autorizar, os resultados dos exames realizados para investigação de Deficiência na Beta-Oxidação Mitocondrial de Ácidos Graxos, e que foram normais, serão utilizados para comparação com pessoas que têm a doença. Caso necessário, dados adicionais serão obtidos dos prontuários. O tempo necessário para participação é em torno de 15 minutos. O material coletado assistencialmente será utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo garantida a confidencialidade das informações obtidas e que você (a pessoa pela qual você é responsável) terá acesso às mesmas. Os resultados obtidos serão agrupados e expressos através de resultados numéricos, sem qualquer referência a elementos que possam identificar as pessoas que participaram do estudo. Após o término do estudo os materiais

biológicos (sangue periférico e urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do grupo, de acordo com a sua decisão de autorizar ou não o uso futuro. Se autorizado, será enviado um novo projeto de pesquisa ao Comitê de Ética e você será chamado a reconseguir com o uso do material armazenado.

Os riscos e desconfortos associados à participação são relacionados ao tempo destinado a responder as perguntas.

Os benefícios associados à participação não são diretos a você, no entanto, as informações obtidas na pesquisa poderão ajudar pacientes com essa mesma condição no futuro

Cabe salientar que a participação no estudo é totalmente voluntária e você poderá se não autorizar a participação sem que haja qualquer interferência no seu atendimento, ou de qualquer familiar no HCPA. Você também poderá desistir a qualquer momento da participação. É importante ressaltar também, que você ou a pessoa pela qual você é responsável não receberão nenhum tipo pagamento pela participação no estudo e que todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa, portanto, serão completamente gratuitas para você.

A pesquisadora responsável pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas) e a pesquisadora assistente (mestranda Maira Silmara de Moraes) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no Serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51) 3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 3359.7640, de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas (assinada por nós) será entregue a você (participante ou responsável legal pelo participante da pesquisa) e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.

Data:_____

Nome do Participante_____

Assinatura do Participante (se aplicável):_____

Nome do responsável:_____

Assinatura do responsável _____

Nome do pesquisador:_____

Assinatura do pesquisador:_____